

## Tesis de Posgrado

# Biosíntesis de glicoproteínas en Mucor Rouxii : Metilación in vivo de residuos de manosa en oligosacáridos con unión N- glicosídica a asparagina

Lederkremer, Gerardo Zelmar

1985

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias  
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Lederkremer, Gerardo Zelmar. (1985). Biosíntesis de glicoproteínas en Mucor Rouxii : Metilación in vivo de residuos de manosa en oligosacáridos con unión N-glicosídica a asparagina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1923\\_Lederkremer.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1923_Lederkremer.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Lederkremer, Gerardo Zelmar. "Biosíntesis de glicoproteínas en Mucor Rouxii : Metilación in vivo de residuos de manosa en oligosacáridos con unión N-glicosídica a asparagina". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1985.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1923\\_Lederkremer.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1923_Lederkremer.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

---

**"BIOSINTESIS DE GLICOPROTEINAS EN *MUCOR ROUXII*"**

**METILACION IN VIVO DE RESIDUOS DE MANOSA EN OLIGOSACARIDOS CON  
UNION N-GLICOSIDICA A ASPARAGINA**

---

Director de Tesis  
DR. ARMANDO JOSE PARODI

Lugar de trabajo  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUIMICAS  
FUNDACION CAMPOMAR

GERARDO ZELMAR LEDERKREMER

Tesis presentada para optar al título de  
DR. EN CIENCIAS QUIMICAS

- 1985 -

1923  
Ej 2



A mis padres y hermanos,

A la Babá Siula,

A la memoria de Juan Carlos y de tantos  
futuros investigadores víctimas del  
Estado Intolerante.



## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Armando J. Parodi por haber estado cerca del ideal en el difícil equilibrio entre orientación, ideas, estímulo y libertad de acción.

A la Dra. Rosa Muchnik de Lederkremer, mi madre, por su orientación en mis primeros pasos en Ciencia.

A los Dres. Nathan Sharon y Harold Flowers del Depto. de Biofísica del Instituto de Ciencias Weizmann, Rehovot, Israel, que permitieron mi primer acercamiento a la Investigación Científica.

Al Consejo Directivo del Instituto de Investigaciones Bioquímicas - Fundación Campomar por haber sabido conservar un instituto de primer nivel académico y un ambiente agradable de trabajo a pesar de la mediocridad y tensión en el país, y haberme permitido trabajar en él durante estos años.

A los Investigadores del Instituto por sus constantes orientaciones y valiosas sugerencias, en especial a los Dres. Luis F. Leloir, Luis Quesada, Luis Ielpi, Roberto Couso, Rodolfo Ugalde y Ricardo Wolosiuk.

Al Personal del Instituto en especial a Margarita por su abnegada colaboración.

A mis compañeros del Instituto, Becarios, Tesistas y Técnicos por tantos momentos agradables, en especial a mis compañeros de laboratorio Daniel Mendelzon y Laura de la Canal por el apoyo mutuo. A Alejandra Raimondi por su buena disposición y su colaboración en HPLC.

A los Dres. Susana Passeron y Miguel Galvagno del Depto. de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la U.B.A. por haberme facilitado la cepa de *Mucor rouxii* y haberme enseñado a cultivarla.

A Liliana Casal, Alicia Couto, Adriana Confalonieri, Gerardo Burton, Rosa Erra y otros investigadores del Depto. de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la U.B.A. por haberme dado reactivos y sugerencias.

A Norberto Malarini por su maestría en la mano alzada y a Carlos, Miguel y Javier por su inestimable ayuda en la preparación de este escrito.



# ABREVIATURAS

Ara	Arabinosa	GDPMan	Guanosina difosfa- to manosa
Asn	Asparagina		
cAMP	Adenosina monofos- fato 3',5' cíclico	Glc	Glucosa
CHO	células de ovario de Hamster chino	GlcNAc	N-acetilglucosami- na
ConA	Concanavalina A	GlcNAc-1-P	N-acetilglucosami- na 1 fosfato
5'-CpG-3' o CpG	Citosina-3'-fosfa- to-Guanosina	GlcNAc-P-P-Dol	N-acetilglucosami- na pirofosfato do- licol
cpm	Cuentas por min.		
DEAE-cel	Dietilaminoetilce- lulosa	GlcNH <sub>2</sub>	Glucosamina
DMSC-	Dimetilsulfinil- carbanión	Glc-P-Dol	Glucosa monofosfa- to dolicol
DMSO	Dimetilsulfóxido	GlcUA	Acido glucurónico
Dol	Dolicol	GTUC	Guanosina timidina pseudouridina ci- tosina
Dol-P	Dolicol monofosfa- to		
Dol-P-P	Dolicol pirofosfa- to	HGPRT	Hipoxantina guani- na fosforribosil transferasa
dpm	desintegraciones por minuto	HPLC	Cromatografía lí- quida de alta efi- cacia
EDTA	Acido etilendia- mintetraacético	Hyl	Acido hialurónico
Endo H	Endo-β-N-acetil- glucosaminidasa H	mA	Metil adenosina
FAB-MS	Espectrometría de masa de bombardeo atómico rápido	m <sup>4</sup> 2A	2,6 di-metil adenosina
Fuc	Fucosa	Man	Manosa
Gal	Galactosa	Manol	Manitol
GalNAc	N-acetilgalactosa- mina	Man-P-Dol	Manosa monofosfa- to dolicol
GalUA	Acido galacturóni- co	m <sup>2</sup> C	2-Metil citosina
		m <sup>4</sup> C	4-Metil citosina
		m <sup>5</sup> C	5-Metil citosina



-IV-

MEM	Medio esencial mínimo	SAhcyst	S-adenosil homocisteína
m <sup>2</sup> G	2-Metil guanosina	SAM	S-adenosil metionina
m <sup>7</sup> G	7-Metil guanosina	S.cerevisiae	Saccharomyces cerevisiae
m <sup>7</sup> GpppN'm-N''	7-Metil-guanosina trifosfato nucleótido ' metil-nucleótido ''	Ser	Serina
m <sup>7</sup> GpppN'm-N''m-N'''	7-Metil-guanosina trifosfato nucleótido' metil-nucleótido'' metil-nucleót. '''	SORB	Sorbitol
m <sup>7</sup> GpppNC	7-Metil-guanosina trifosfato metil-citosina	TCA	Acido tricloroacético
M.rouxii	Mucor rouxii	Thr	Treonina
mU	Metil uridina	TK	Timidina quinasa
N <sup>2</sup> di-mG	Nitrógeno 2 dimetil guanosina	TLC	Cromatografía en capa delgada
NDF-azucar	Nucleótido difosfato azucar	Tris	Tris(hidroximetil) amino-metano
NeuNAc	Acido N-acetilneuramínico (siálico)	UDPGal	Uridina difosfato galactosa
N <sup>2</sup> mG	Nitrógeno 2 metil-guanosina	UDPGlc	Uridina difosfato glucosa
PHA	Fitoheмоaglutinina	UDPGlcNAc	Uridina difosfato N-acetilglucosamina
POPOP	2,2-parafenilenbis-5-fenil oxazol	UDPXil	Uridina difosfato xilosa
PPO	2,5-difenil oxazol	VSV	Virus de la estomatitis vesicular
Ramn	Ramnosa	WGA	Aglutinina de germen de trigo
Rf	Relación de frente	Xil	xilosa
Rib	Ribosa	YNB	medio de cultivo: base nitrogenada de levadura (libre de carbohidratos)
RMN	Resonancia magnética nuclear	YPG	medio de cultivo: extracto de levadura, peptona, glucosa.
SA	Acido siálico (neuramínico)		

## INDICE

RESUMEN . . . . .	1
SUMMARY . . . . .	5

### A. INTRODUCCION

#### I. GLICOPROTEINAS

1. DEFINICION . . . . .	9
2. DISTRIBUCION Y FUNCIONES . . . . .	10
3. PORCENTAJE DE GLICOSILACION Y AZUCARES COMPONENTES . . . . .	11
4. TIPOS DE ENLACE . . . . .	12
5. UNIONES O-GLICOSIDICAS A SERINA O TREONINA	14
6. UNIONES O-GLICOSIDICAS A HIDROXILISINA E HIDROXIPROLINA . . . . .	16
7. UNIONES N-GLICOSIDICAS A ASPARAGINA . . .	17
a) ESTRUCTURA DEL PEPTIDO . . . . .	18
b) OLIGOSACARIDOS DE TIPO "COMPLEJO" . . .	19
c) OLIGOSACARIDOS DE TIPO "SIMPLE" O POLIMANOSA . . . . .	21
d) OLIGOSACARIDOS DE TIPO "HIBRIDO" . . .	22
8. PRESENCIA DE DIVERSOS TIPOS DE OLIGOSACARIDOS EN UNA MISMA GLICOPROTEINA	22
9. MICROHETEROGENEIDAD . . . . .	23
10. AISLAMIENTO Y DETERMINACION ESTRUCTURAL .	24
a) AISLAMIENTO Y SEPARACION DE GLICOPEPTIDOS . . . . .	24
b) TIPO DE ENLACE - SEPARACION DE LA PORCION SACARIDICA . . . . .	25
c) ESTRUCTURA DEL OLIGOSACARIDO . . . . .	26

#### II. GLICOPROTEINAS EN HONGOS

1. <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> . . . . .	31
2. OTROS HONGOS - MANANOS SUSTITUIDOS . . . .	33

#### III. GLICOSILACION DE PROTEINAS

1. UNION O-GLICOSIDICA . . . . .	37
2. UNION N-GLICOSIDICA . . . . .	38

a) BIOSINTESIS DE OLIGOSACARIDOS LIGADOS N-GLICOSIDICAMENTE A PROTEINA EN MAMIFEROS . . . . .	38
i) Dolicol-P-P-oligosacárido intermediario . . . . .	39
ii) Dolicol . . . . .	41
iii) Sintesis del oligosacárido intermediario unido a dolicol . . . .	43
iv) Transferencia del oligosacárido a proteína . . . . .	43
v) Procesamiento de oligosacáridos unidos N-glicosidicamente a proteína	46
b) TRIPANOSOMATIDOS . . . . .	47
c) <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> . . . . .	49
3. FUNCIONES DE LA GLICOSILACION DE PROTEINAS	50
a) SEÑAL PARA EL TRANSPORTE DE PROTEINAS A MEMBRANA O PARA SU SECRECION . . . .	51
b) FUNCION ESTRUCTURAL . . . . .	51
c) CONFORMACION PROTEICA . . . . .	51
d) COBERTURA ESPACIAL DE LA PROTEINA . .	52
e) ACTIVIDAD ENZIMATICA . . . . .	52
f) SEÑAL DE RECONOCIMIENTO . . . . .	52
g) TRANSFORMACION CELULAR . . . . .	54

#### IV. METILACION IN VIVO

1. METILACION DE DNA . . . . .	55
2. METILACION DE RNA . . . . .	58
3. METILACION DE PROTEINAS . . . . .	60
4. METILACION DE POLISACARIDOS . . . . .	62
5. METILACION DE GLICOPROTEINAS . . . . .	66

#### V. *MUCOR ROUXII* - DIMORFISMO

1. TAXONOMIA Y BIOLOGIA DE <i>MUCOR ROUXII</i> . . .	67
2. DATOS HISTORICOS . . . . .	70
3. DIMORFISMO . . . . .	71
4. S-ADENOSIL METIONINA Y DIMORFISMO EN <i>MUCOR RACENOSUS</i> . . . . .	75
5. POLIMEROS DE PARED CELULAR DE <i>MUCOR ROUXII</i>	75

#### B. MATERIALES Y METODOS

##### I. MATERIALES

1. PRECURSORES RADIOACTIVOS . . . . .	77
2. ENZIMAS . . . . .	77

3. STANDARDS . . . . .	77
------------------------	----

## II. METODOS

1. DEGRADACIONES ENZIMATICAS . . . . .	83
2. HIDROLISIS . . . . .	85
3. DEGRADACION CON FENOL . . . . .	87
4. ACETOLISIS . . . . .	87
5. OXIDACION CON PERIODATO . . . . .	88
a) DERIVADOS DE DOLICOL . . . . .	89
b) MONOSACARIDOS . . . . .	89
6. ANALISIS DE METILACION . . . . .	89
7. DESETERIFICACION (DEMETILACION) . . . . .	91
8. REDUCCION CON BOROHIDRURO DE SODIO . . . . .	91
9. CROMATOGRAFIA EN BIOGEL P6 . . . . .	92
10. CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G75 . . . . .	92
11. CROMATOGRAFIA EN DEAE-CELULOSA . . . . .	92
a) PARA DOLICOL-P-MONOSACARIDOS . . . . .	92
b) PARA DOLICOL-P-P-OLIGOSACARIDOS . . . . .	93
12. CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA (TLC) . . . . .	93
13. CROMATOGRAFIA EN PAPEL . . . . .	94
14. ELECTROFORESIS EN PAPEL . . . . .	94
15. HPLC . . . . .	95
16. SOLVENTES . . . . .	95
17. MEDICIONES DE RADIOACTIVIDAD . . . . .	96
18. AUTORADIOGRAFIA . . . . .	97

## III. EXPERIMENTAL

1. CULTIVOS DE <i>MUCOR ROUXII</i> . . . . .	99
a) OBTENCION DE ESPORAS . . . . .	99
b) OBTENCION DE CELULAS DE MICELIO . . . . .	99
c) OBTENCION DE CELULAS LEVADURIFORMES . . . . .	100
d) OBTENCION DE CELULAS MICELARES EN MEDIO DEFINIDO . . . . .	100
2. MARCACION RADIOACTIVA <i>IN VIVO</i> . . . . .	100
a) [U- <sup>14</sup> C] GLUCOSA . . . . .	100
i) Marcación continua . . . . .	100
ii) Pulso y <i>chase</i> . . . . .	101
b) [1,6- <sup>3</sup> H] N-ACETILGLUCOSAMINA . . . . .	101
c) L- [METIL- <sup>14</sup> C] METIONINA . . . . .	102
i) Marcación continua . . . . .	102
ii) Pulso y <i>chase</i> . . . . .	102
3. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE DOLICOL-P- MONOSACARIDOS . . . . .	103
4. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE DOLICOL-P-P- OLIGOSACARIDOS . . . . .	104

5. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE OLIGOSACARIDOS DE GLICOPROTEINAS . . . . .	104
--	-----

## C. RESULTADOS

I. CARACTERIZACION DE DOLICOL-P-MONOSACARIDOS . .	107
II. SEPARACION DE DOLICOL MONOFOSFATO MANOSA Y DOLICOL MONOFOSFATO GLUCOSA POR TLC . . . . .	114
1. TRATAMIENTO CON PERIODATO DE DERIVADOS DE DOLICOL . . . . .	114
2. FILTRACION POR GEL DE LOS DERIVADOS DE DOLICOL-P . . . . .	117
III. TAMAÑO DE LA PORCION LIPIDICA . . . . .	118
IV. CARACTERIZACION DE DOLICOL-P-P-OLIGOSACARIDOS	120
1. PORCION SACARIDICA DEL DOLICOL-P-P- OLIGOSACARIDO . . . . .	123
2. ESTRUCTURA DEL OLIGOSACARIDO . . . . .	123
a) EXTREMO REDUCTOR . . . . .	127
b) TRATAMIENTO CON $\alpha$ -MANOSIDASA . . . . .	127
c) UNIONES . . . . .	127
V. AISLAMIENTO DE OLIGOSACARIDOS DE GLICOPROTEINAS . . . . .	132
1. SEPARACION DE OLIGOSACARIDOS POR ELECTROFORESIS EN TETRABORATO DE SODIO . .	136
2. TRATAMIENTO CON $\alpha$ -MANOSIDASA . . . . .	138
3. TRATAMIENTO CON $\alpha$ -MANOSIDASA POSTERIOR A OTROS TRATAMIENTOS QUIMICOS Y ENZIMATICOS	138
4. SUSTITUYENTES CARGADOS . . . . .	145
VI. IDENTIFICACION DE 3-O-METILMANOSA . . . . .	149
1. HIDROLISIS ACIDA TOTAL . . . . .	149
2. TRATAMIENTO DE DESETERIFICACION . . . . .	149
3. POSICION DE LA SUSTITUCION . . . . .	152
a) TRATAMIENTO CON PERIODATO DE SODIO . .	152
b) ELECTROFORESIS EN MOLIBDATO DE SODIO .	154
VII. MARCACION DE OLIGOSACARIDOS CON [METIL- $^{14}$ C] METIONINA . . . . .	154

1. MARCACION . . . . .	154
2. MARCACION Y CHASE . . . . .	157
VIII. MARCACION Y CHASE CON N-ACETIL- [ <sup>3</sup> H] GLUCOSAMINA . . . . .	157
IX. ESTRUCTURAS DE ALGUNOS OLIGOSACARIDOS . . . . .	163
1. OLIGOSACARIDOS MARCADOS A TIEMPOS BREVES DE INCORPORACION . . . . .	163
a) Man <sub>6</sub> GlcNAc . . . . .	163
b) Man <sub>7</sub> GlcNAc . . . . .	167
2. OLIGOSACARIDOS MARCADOS A TIEMPOS LARGOS DE INCORPORACION . . . . .	169
a) Man <sub>6</sub> GlcNAc . . . . .	169
b) Man <sub>12</sub> GlcNAc . . . . .	173
c) Oligosacaridos grandes (Man <sub>30</sub> GlcNAc) . . . . .	177
X. GLUCOSILACION TRANSITORIA . . . . .	181
MARCACION Y CHASE DE OLIGOSACARIDOS IN VIVO CON [U- <sup>14</sup> C] GLUCOSA . . . . .	182
D. DISCUSION Y CONCLUSIONES	
I. DOLICOL-P-MONOSACARIDOS . . . . .	189
II. SEPARACION DE DOLICOL MONOFOSFATO MANOSA Y DOLICOL MONOFOSFATO GLUCOSA . . . . .	191
III. DOLICOL-P-P-OLIGOSACARIDOS . . . . .	193
IV. GLICOPROTEINAS . . . . .	196
1. 3-O-METILMANOSA Y DIMORFISMO . . . . .	196
2. BIOSINTESIS DE GLICOPROTEINAS Y DIMORFISMO . . . . .	198
BIBLIOGRAFIA . . . . .	203



## RESUMEN

Estaba descripto que la forma levadura del hongo dimórfico *Mucor rouxii* contenía en su pared celular 6 veces más manosa que la forma micelar. Contenía también mayor cantidad de proteína. Dado que en *Saccharomyces cerevisiae* uno de los componentes de la pared celular es una manoproteína (manano), esto nos llevó a pensar que podía existir una diferencia en la glicosilación de proteínas entre las dos formas de *Mucor rouxii*.

Se incubaron entonces células de ambas formas de *Mucor rouxii* con [U- $^{14}$ C]glucosa *in vivo*. Se encontraron dolicol-monofosfato manosa y dolicol-monofosfato glucosa en ambas formas celulares. Se determinó que estos intermediarios en la biosíntesis de glicoproteínas tenían una porción lipídica de igual tamaño, de unas 16 unidades isoprenoides, es decir igual a la de *Saccharomyces cerevisiae* y menor a la de mamíferos. Se diseñó un sistema cromatográfico que permitió la separación de dolicol-monofosfato glucosa y dolicol-monofosfato manosa. Investigando las causas de esa separación se concluyó que se debía a la porción sacarídica y no a la lipídica de las moléculas. Se determinó entonces que tanto en *M. rouxii* como en mamíferos los dolicoles que transportan glucosa o manosa tienen igual tamaño, dependiendo éste del organismo del que provienen, en contraposición con especulaciones previas de otros grupos que sugerían un tamaño diferente para dolicoles que transportan glucosa o manosa.

Se aisló un lípido-oligosacárido que resultó ser Glc $\rightarrow$ Man $\rightarrow$ GlcNAc $\rightarrow$ -P-P-dolicol. Se estudió la estructura de la porción sacarídica de este compuesto que resultó igual a la del intermediario en la N-glicosilación de proteínas en mamífe-





ros. Tampoco en este caso se encontraron diferencias entre las dos formas celulares del hongo.

Sí se encontraron diferencias relacionadas con el dimorfismo en el procesamiento de oligosacáridos con unión N-glicosídica a asparagina en glicoproteínas del hongo. Se estudiaron oligosacáridos de tipo "polimánosa" y "manano" separados de proteína por acción de endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa H. En la forma levadura se marcaron oligosacáridos grandes (mananos) a tiempos muy breves (5 minutos) de incubación con [U- $^{14}$ C]glucosa. En la forma micelar en cambio se necesitaron tiempos largos (180 minutos) de incubación para marcar en forma apreciable estos compuestos.

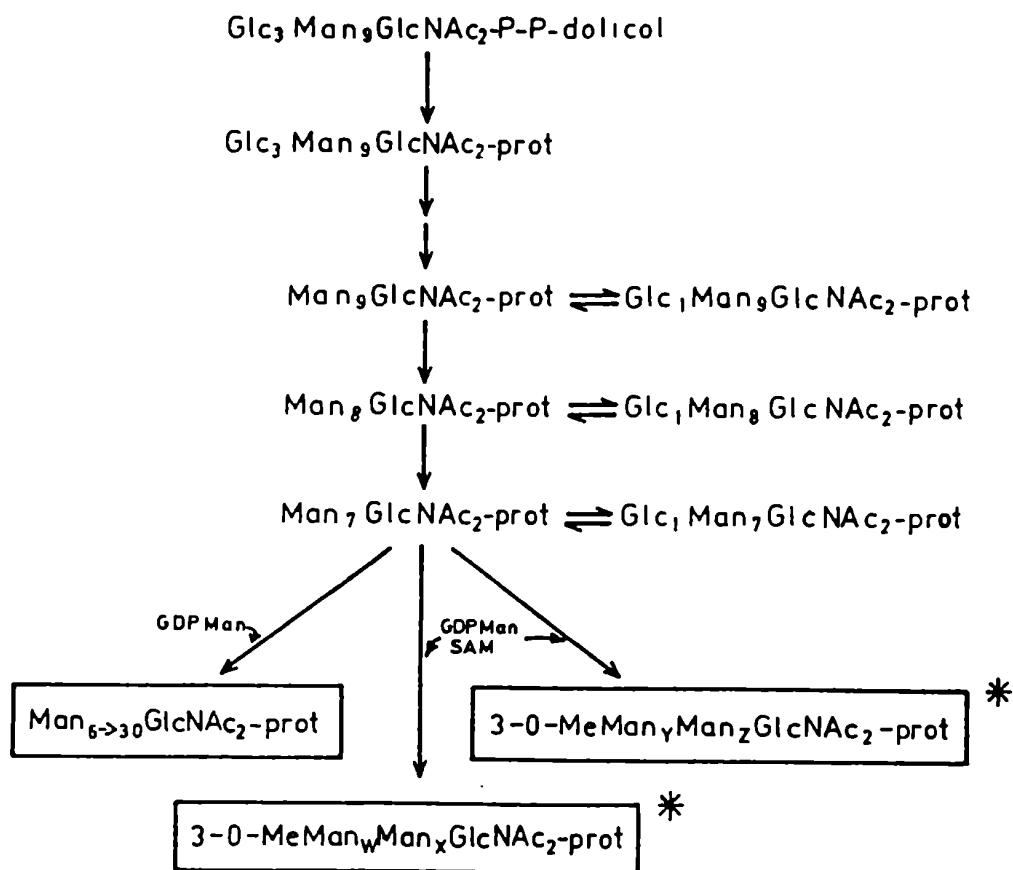
Por la cinética de incorporación de marca radioactiva, por incubación de células con [ $^{14}$ C]glucosa o [ $^3$ H]N-acetilglucosamina, se vio que el oligosacárido transferido inicialmente a proteína debía perder sus residuos de glucosa y uno o dos de manosa para luego adicionar residuos de manosa y quedar como productos finales unidos por unión N-glicosídica a proteína una serie de oligosacáridos de estructura  $\text{Man}_n\text{GlcNAc}_2$ , siendo  $n = 6$  a  $>30$ . Pero también se lograron separar otras dos series de oligosacáridos también unidos a asparagina, como productos finales, siendo en una serie los oligosacáridos totalmente resistentes a degradación con  $\alpha$ -manosidasa y en la otra parcialmente. Se investigó a qué se debía esa resistencia y se encontró que era debido a una metilación en posición 3 de algunos residuos de manosa. Por incubación *in vivo* de células con [metil- $^{14}$ C]metionina se logró marcar oligosacáridos con unión N-glicosídica sólo en sus residuos metilados. Se vio que una vez metilada una manosa se interrumpía el crecimiento de esa cadena. La metilación ocurría en mucho mayor proporción en las células de la forma micelar.

Finalmente se comprobó que en *Mucor rouxii* ocurre



glucosilación transitoria de los oligoscáridos  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$  y  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$  unidos N-glicosidicamente a proteína. Esta reacción se había encontrado en mamíferos, plantas y protozoarios, pero no se había podido detectar en *S. cerevisiae*.

El esquema que se concluyó para la transferencia y procesamiento de oligosacáridos con unión N-glicosídica a proteína en *M. rouxii* es el siguiente:



\* mucho mas abundantes en la forma micelar



Aparte de las diferencias observadas en la biosíntesis de glicoproteínas relacionadas con el dimorfismo de *Mucor rouxii*, es la primera vez que se describe la ocurrencia de metilación en oligosacáridos con unión N-glicosídica en glicoproteínas.

También es importante destacar el hallazgo de que glucosa y manosa son transferidas en la biosíntesis de glicoproteínas por un lípido (dolicol) de igual tamaño en los dos casos cuando la reacción ocurre en un mismo organismo.

Una parte de los resultados obtenidos y descriptos en esta Tesis han sido publicados en los siguientes artículos<sup>1,2</sup>:

"Separation of dolichol monophosphate mannose and dolichol monophosphate glucose by thin-layer chromatography".

Lederkremer, G.Z. & Parodi, A.J. (1983)

J.Chromatography 262, 299-304.

"3-O-Methylation of mannose residues. A novel reaction in the processing of N-linked oligosaccharides occurring in *Mucor rouxii*".

Lederkremer, G.Z. & Parodi, A.J. (1984)

J.Biol.Chem. 259, 12514-12518.



## SUMMARY

Yeast-form cells of the dimorphic fungus *Mucor rouxii* had been described to contain 6 times more mannose in their walls than those in the mycelial-form. They also had a higher amount of protein. On the other hand one of the constituents of the cell wall in *Saccharomyces cerevisiae* is a mannoprotein (mannan) and thus we were lead to think there could be a difference in the biosynthesis of glycoproteins in both forms of *Mucor rouxii*.

Cells of both forms of *Mucor rouxii* were incubated *in vivo* with [U-<sup>14</sup>C]glucose. Dolichol-monophosphate mannose and dolichol-monophosphate glucose were found in the two cellular forms. The size of the lipid moiety of these intermediates in the biosynthesis of glycoproteins was the same in both forms, about 16 isoprene units. This size is similar to that occurring in *Saccharomyces cerevisiae* and shorter than in mammals. A chromatographic system was developed that allowed separation of dolichol-monophosphate glucose and dolichol-monophosphate mannose. Separation was due to differences in the saccharide and not the lipid moieties of the molecules. In *Mucor rouxii* as well as in mammals the dolichols transporting glucose or mannose were found to have the same size, the latter only depending on the organism which they came from. This ruled out previous speculations by other groups that suggested a different size for dolichols transporting glucose or mannose residues.

A lipid-oligosaccharide was isolated that turned out to be Glc $\rightarrow$ Man $\rightarrow$ GlcNAc $\rightarrow$ -P-P-dolichol. The structure of the saccharide moiety of this compound was studied and found to be the same as that in the intermediate in the protein N-



•

•

|

glycosylation in mammals. Again, no differences were found between both cellular forms of the fungus.

Differences related with dimorphism were nevertheless found in the processing of oligosaccharides N-glycosidically linked to asparagine in glycoproteins of the fungus. "High mannose" and "mannan" type oligosaccharides detached from protein by endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase H were studied. Large oligosaccharides (mannans) were labeled after very short pulses (5 minutes) with [U- $^{14}$ C]glucose in the yeast-form. Mycelial-form cells needed in contrast long pulses (180 minutes) to label noticeably those compounds.

By incubation of cells with [ $^{14}$ C]glucose or [ $^3$ H]N-acetylglucosamine, labeling kinetics indicated that the oligosaccharide initially transferred to protein lost the glucose and one or two mannose residues. Addition of new mannose residues then took place yielding as final products a series of oligosaccharides with the general structure  $\text{Man}_n\text{GlcNAc}_2$ , being  $n = 6$  to  $>30$ . Two other series of N-linked oligosaccharides were separated, being the oligosaccharides in one of them completely resistant to  $\alpha$ -mannosidase degradation and only partially resistant in the other series. Studies were undertaken to establish the cause of the resistance. Oligosaccharides were found to be methylated in position 3 of some mannose residues. By incubating cells *in vivo* with [methyl- $^{14}$ ]methionine N-linked oligosaccharides were labeled only on the methylated residues. After methylation the chain carrying the methylated residue stopped growing. Methylation was found to be much more abundant in the mycelial-form.

Finally, transient glucosylation of protein N-linked  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$  and  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$  was found to occur in *Mucor rouxii*. This reaction had been described in mammals, plants and protozoa but it had not been found in *S. cerevisiae*.

•

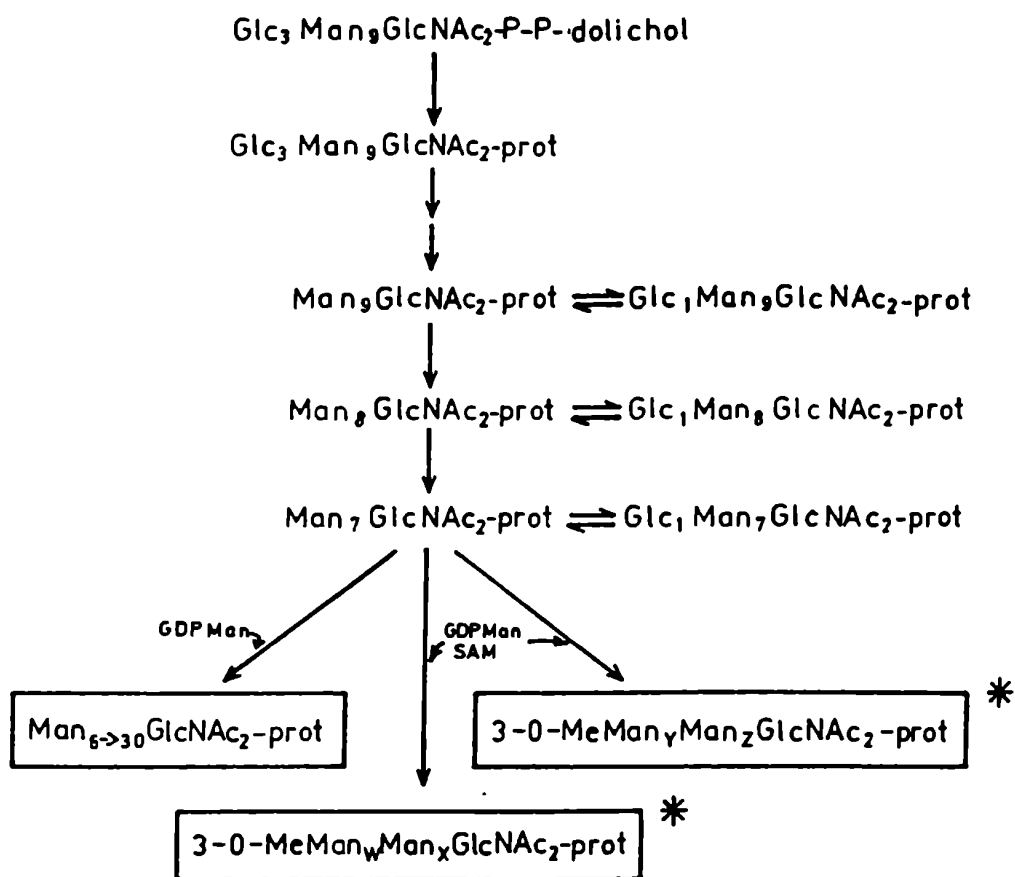
•

•

•

•

In conclusion, the final scheme for transfer and processing of N-linked oligosaccharides in *Mucor rouxii* is the following:



\* more in the mycelial form



In addition to the observed differences in the biosynthesis of glycoproteins related to dimorphism in *Mucor rouxii*, this is the first report of methylation occurring in N-linked oligosaccharides in glycoproteins.

It is also worth to point out the finding that in the biosynthesis of glycoproteins glucose and mannose residues are transferred by a lipid (dolichol) of the same size when the reaction occurs in the same organism.

Part of the results obtained and described in this Thesis have been published in the following articles:

"Separation of dolichol monophosphate mannose and dolichol monophosphate glucose by thin-layer chromatography".

Lederkremer, G.Z. & Parodi, A.J. (1983)

J.Chromatography 262, 299-304.

"3-O-Methylation of mannose residues. A novel reaction in the processing of N-linked oligosaccharides occurring in *Mucor rouxii*".

Lederkremer, G.Z. & Parodi, A.J. (1984)

J.Biol.Chem. 259, 12514-12518.



# INTRODUCCION





## I. GLICOPROTEINAS

### I.1. DEFINICION:

Glicoproteínas son proteínas que llevan unidas covalentemente al esqueleto peptídico cadenas de mono, oligo o polisacáridos. Los azúcares les dan propiedades físico-químicas características que las diferencian de las proteínas puras.<sup>3</sup>

Desde fines del siglo pasado, en que se encontraron ciertas moléculas que contenían una parte proteica y otra que por hidrólisis liberaba monosacáridos, la atención se enfocó sobre las glicoproteínas de secreciones mucosas, las mucoproteínas, los hoy llamados proteoglicanos. (Para una revisión histórica ver Glycoproteins de A. Gotschalk<sup>4</sup>). Se las dividió luego en mucoides y "mucinas verdaderas" (Hammarsten, 1931), siendo las últimas provenientes de secreciones de la mucosa respiratoria u otros tractos, y las primeras, moléculas con características parecidas pero provenientes de otras fuentes. En toda otra proteína que no presentara las características típicas de mucoproteínas se consideraban los azúcares existentes como impurezas. Levene, en 1925, llegó a afirmar erróneamente que todas las mucoproteínas debían tener hexosaminas, ácido glucurónico y sulfato. (Esto sólo se cumplió para el keratan sulfato).

El advenimiento de nuevos métodos de aislamiento y purificación permitió una mejor caracterización de las glicoproteínas. El prefijo mucó fue eliminado por su carácter indeterminado por proposición de Jeanloz en 1960. Gotschalk<sup>4</sup> propuso la división entre las proteínas-polisacáridos (con oligosacáridos de cadena larga, no ramificados y con unidades repetitivas) y las glicoproteínas (con oligosacáridos cortos,

ramificados). Pero surgieron demasiadas excepciones para ambas subdivisiones. Por eso en los últimos años se consideran a ambos tipos de compuestos como glicoproteínas <sup>3,6,7</sup>. La definición más práctica la da Sharon en 1975<sup>8</sup>: "Las glicoproteínas son proteínas con azúcares ligados a ellas por enlaces glicosídicos".

Hoy en día se sabe que la mayoría de las proteínas de secreción son glicoproteínas (por ejemplo casi todas las presentes en el plasma sanguíneo).

## **1.2. DISTRIBUCION Y FUNCIONES:**

Se han encontrado glicoproteínas en todos los eucariotes estudiados, desde organismos unicelulares (protozoarios), algas, hongos, plantas, hasta mamíferos. También las poseen los virus de eucariotes. También existen y se están estudiando en los últimos años, en las Archaeobacteriae <sup>7</sup>. Hay evidencias poco firmes, sin embargo, de que las Eubacteriae tengan glicoproteínas <sup>8,7,10</sup>.

Las glicoproteínas pueden cumplir funciones diversas. Cumplen funciones estructurales, como el colágeno y los proteoglicanos en el tejido conectivo, o los polisacáridos ligados a proteína en paredes celulares de hongos, algas y plantas. Intervienen en las interacciones célula-célula; en la adhesión de células a un sustrato. Determinan la migración de células a lugares específicos. Como se dijo antes la mayoría de las proteínas del plasma sanguíneo son glicoproteínas: proteínas de transporte (por ej. transferrina), los factores de coagulación, casi todos los factores del complemento, los determinantes de grupo sanguíneo. En las mucinas y otras moléculas de secreción mucosa cumplen una función lubricante. Las enzimas secretadas son en general glicoproteínas (inver-

tasa,  $\alpha$ -amilasa) y también muchas plasmáticas (ribonucleasa). Las inmunoglobulinas son glicoproteínas, así como muchas hormonas. (Se volverá a este tema al hablar de las funciones de la glicosilación en la sección III.3).

### I.3. PORCENTAJE DE GLICOSILACION Y AZUCARES COMPONENTES:

El porcentaje de glicosilación de glicoproteínas, medido como relación molar de azúcares ligados a proteína puede variar del 5 al 95 % <sup>8</sup>. Glicoproteínas como la ovoalbumina, algunas inmunoglobulinas, o en plantas lectinas como la aglutinina de soya tienen menos del 5% de azúcar. Glicoproteínas determinantes de grupo sanguíneo o enzimas como la invertasa de levadura tienen más del 90% de azúcar.

En 1975 Sharon<sup>9</sup> señaló que de los más de cien monosacáridos conocidos sólo una docena eran componentes de glicoproteínas, agregando que era muy poco probable que este grupo se ampliara con investigaciones posteriores. Este grupo incluía: D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, L-fucosa, L-arabino-sa, D-xilosa, D-glucurónico, L-idurónico, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, N-acetilneuramínico y N-glicolilneuramínico. A este grupo deben agregarse residuos sustituidos con grupos sulfato o fosfato. También residuos metilados como se describe en esta Tesis. La galactosa puede estar también en su forma furanósica<sup>11,12,13</sup>. No sería improbable que se ampliara este grupo de azúcares en investigaciones futuras, especialmente revisando estructuras de glicoproteínas de eucariotes inferiores, antes tomadas como polisacáridos (por ej. los mananos), porque se perdía la parte proteica por los drásticos métodos de purificación utilizados.

Es importante señalar que a veces el cambio de un solo residuo de azúcar en una cadena de oligosacárido de una glico-

proteína puede traer cambios fundamentales en su función, como es el caso de los determinantes de grupo sanguíneo. (fig. 1)

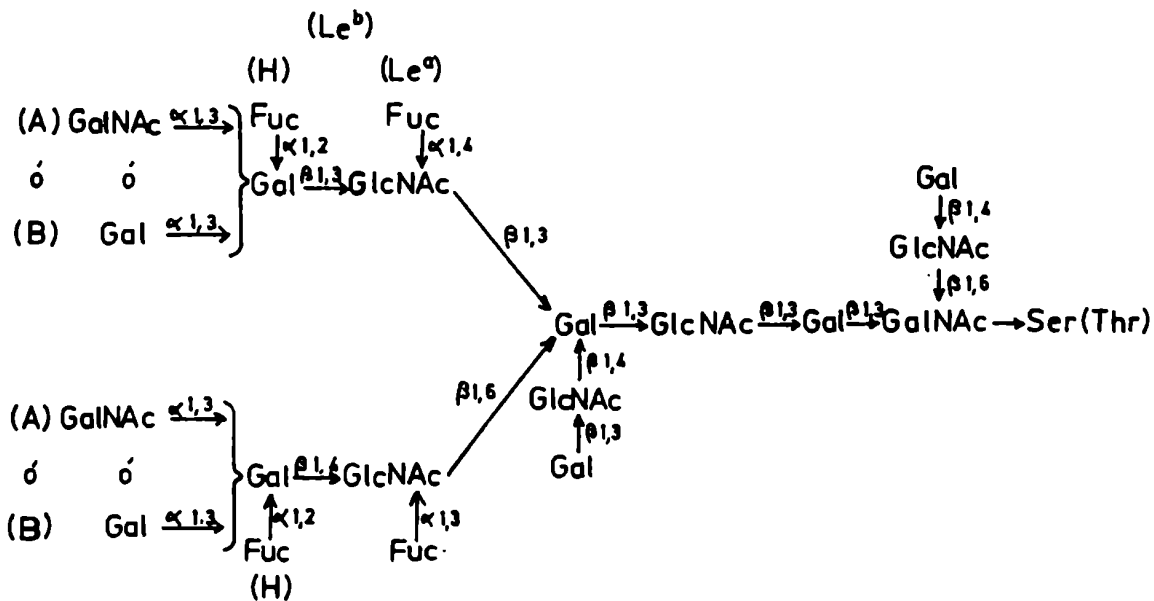


Fig. 1. Estructura general de oligosacáridos con unión O-glicosídica a proteína, determinantes de especificidad de grupo sanguíneo humano. La presencia de los residuos señalados determina la especificidad de grupo A, B, H, Le<sup>a</sup>, Le<sup>b</sup>, I e i.

#### **I.4. TIPOS DE ENLACE:**

Una característica fundamental de las glicoproteínas es la unión de la parte sacarídica a la proteína. Los oligosacáridos con la misma unión a proteína generalmente se forman por el mismo camino biosintético. Es interesante señalar

que la determinación de los tipos de enlace a proteína es reciente; el primer enlace fue caracterizado a mediados de la década del '60.

Existen dos tipos principales de unión del azúcar a la proteína: las N-glicosídicas y las O-glicosídicas. Las uniones N-glicosídicas se establecen entre N-acetilglucosamina y el grupo amido de asparagina (fig. 2). Las O-glicosídicas pueden ser uniones lábiles a álcali diluido: entre el hidroxilo de serina o treonina y N-acetilgalactosamina, manosa o xilosa. También hay descritas uniones a Ser(Thr) de galactosa y de fucosa. Las uniones O-glicosídicas pueden ser también resistentes a tratamiento alcalino suave; éste es el caso de la unión galactosa a hidroxilisina y de galactosa o arabinosa a hidroxiprolina <sup>10,14</sup>.

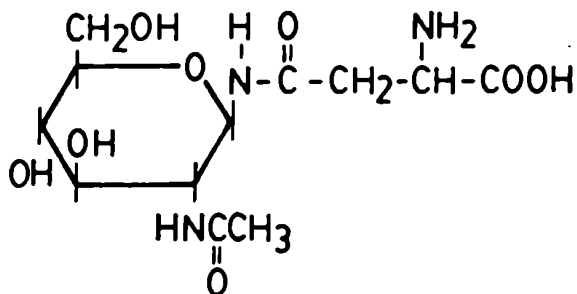


Fig. 2. Unión N-glicosídica a proteína. N-acetilglucosamina  $\beta$  asparagina.

Hay algunos trabajos que identifican otras uniones más raras, como la unión S-glicosídica de glucosa a cisteína en eritrocitos humanos <sup>15,16</sup>. Recientemente se determinó la estructura de oligosacáridos unidos a asparagina a través de glucosa en arqueobacterias <sup>17</sup>.

### 1.5. UNIONES O-GLICOSIDICAS A SERINA O TREONINA:

En muchas glicoproteínas la unión de los oligosacáridos a serina o treonina se da a través de un residuo de N-acetil galactosamina. Este tipo de unión lo tienen las mucinas<sup>19</sup>, algunos proteoglicanos<sup>17</sup>, proteínas anti-congelamiento de peces<sup>20</sup>, fetuina y muchas otras. Un grupo importante de glicoproteínas que contienen este tipo de unión son las que determinan especificidad de grupo sanguíneo<sup>21</sup> (fig. 1). Como vemos en la figura 1, el cambio en un residuo de los extremos no reductores significa una nueva especificidad de grupo.

En algunos proteoglicanos (heparina, condroitinsulfato) (fig. 3)<sup>22</sup> la unión a serina o treonina es por un residuo de xilosa. Se han encontrado también galactosa<sup>23</sup> y fucosa<sup>24</sup> formando unión con serina o treonina.

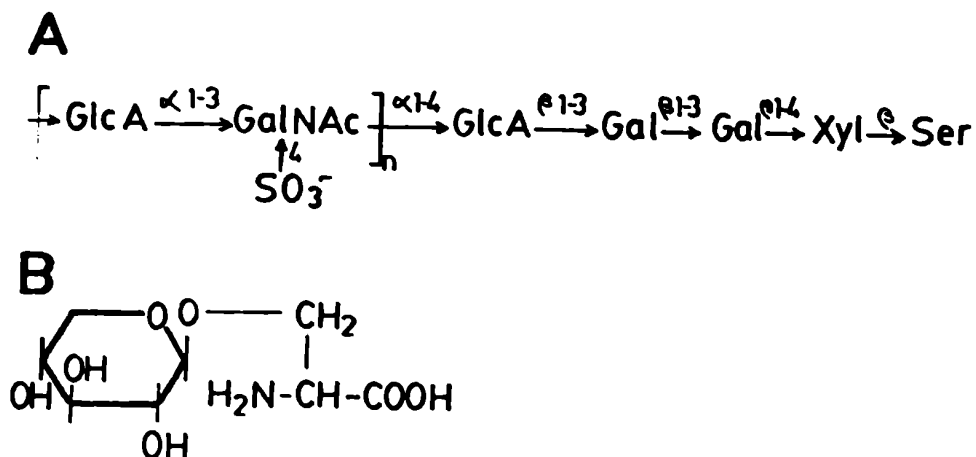


Fig. 3. A. Estructura del condroitinsulfato. B. union O-glicosidica labil al alcali, xilosa  $\beta \rightarrow$  serina.

-15-

Muy comun en glicoproteínas de hongos y levaduras son uniones a serina o treonina a través de manosa. Esto ocurre en los mananos como el de *Saccharomyces cerevisiae*<sup>20</sup> (fig. 4). Recientemente se describió también unión de manosa a serina o treonina en cerebro de rata <sup>24</sup>.

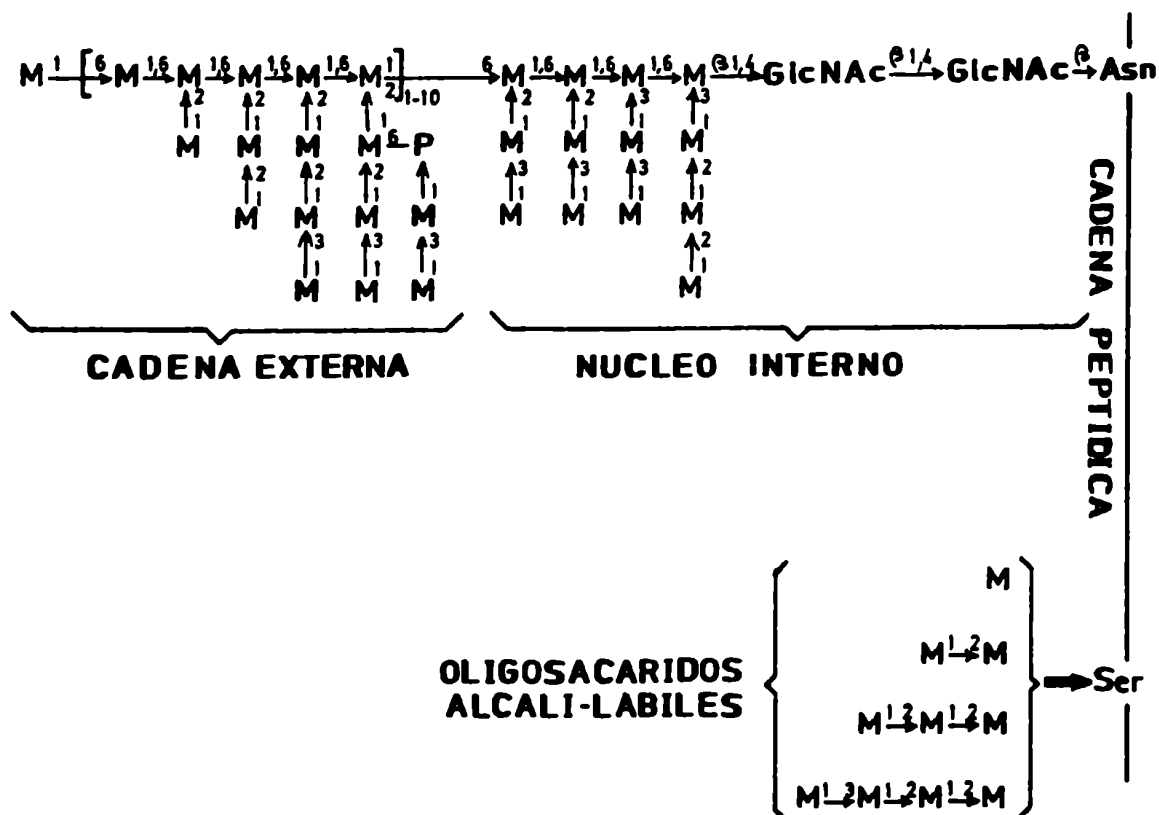


Fig. 4. Estructura del Manano de *Saccharomyces cerevisiae*. Todas las uniones son  $\alpha$  salvo las especificadas como  $\beta$ . M= manosa, P= fosfato.



# I.6. UNIONES O-GLICOSIDICAS A HIDROXILISINA E HIDROXIPROLINA:

Se han encontrado uniones a hidroxilisina en las distintas clases de colágeno<sup>27</sup> y en glicoproteínas de membrana basal<sup>28</sup>. La estructura mas común es Glc-Gal-Hyl<sup>14</sup>.

En plantas se ha encontrado en las extensinas unión de arabinosa a hidroxiprolina<sup>29</sup>. Esta unión posee características similares a las de la unión de hidroxilisina, en cuanto a su resistencia a hidrólisis alcalina (fig. 5).

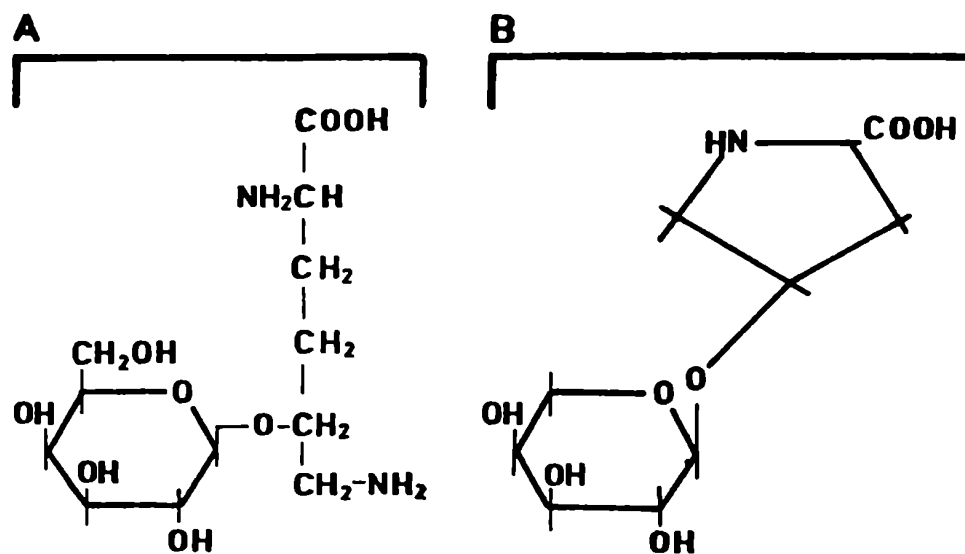


Fig. 5. Uniones O-glicosídicas a proteína resistentes a álcali. A. galactosa  $\beta$ → hidroxilisina. B. arabinosa  $\beta$ → hidroxiprolina.

### 1.7. UNIONES N-GLICOSIDICAS A ASPARAGINA:

Los oligosacáridos que están unidos a proteínas por unión N-glicosídica en eucariotes tienen una parte de su estructura común a todos. Esta región de 2 N-acetilglucosaminas y 3 manosas a partir del extremo reductor es el llamado núcleo ("core"); como vemos en la figura 6 la unión al grupo amido de la asparagina se da a través de un residuo de N-acetil glucosamina con anomería  $\beta$ . A la GlcNAc de la unión está ligado otro resto de GlcNAc formando una N,N'-diacetil quitobiosa. Luego vienen tres manosas, la primera de ellas unida por unión  $\beta$ ; las otras dos manosas, así como cualquier otra que contenga el oligosacárido tendrá anomería  $\alpha$ .

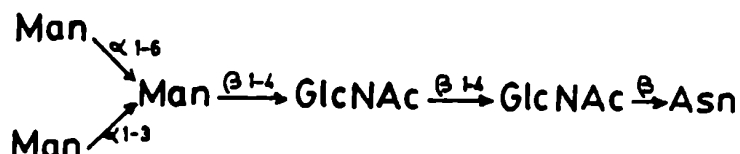


Fig. 6. Estructura del *núcleo interno*  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-Asn}$  de oligosacáridos unidos N-glicosídicamente a proteína.

Dependiendo de los azúcares que se unan al "núcleo" tendremos oligosacáridos de tipo "simple" o "polimanosos" o de tipo "complejo". Los del 1<sup>er</sup> tipo poseen sólo residuos de manosa, mientras que los de tipo complejo llevan unidas al "núcleo" restos de galactosa, N-acetilglucosamina, ácido siálico y fucosa. Una tercera clase son los llamados oligosacáridos de tipo "híbrido". Estos pueden poseer los azúcares del tipo "complejo" pero poseen más residuos de manosa (fig. 7).

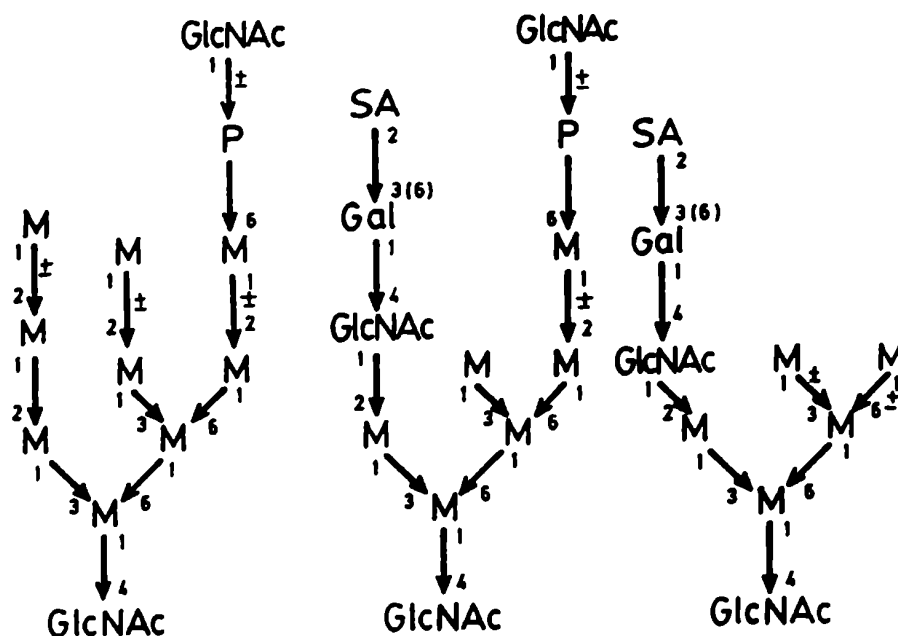


Fig. 7. Algunos oligosacáridos de tipo "híbrido", liberados de proteína por Endo H <sup>43</sup>. M= manosa, SA= ácido siálico.

### 1.7.a) ESTRUCTURA DEL PEPTIDO:

Con respecto a la estructura del péptido en la zona de la unión N-glicosídica se han encontrado algunas características en común. Ya hace algunos años se determinó que era necesaria la existencia de una treonina o serina dos residuos hacia el extremo carboxi-terminal de la asparagina participante de la unión N-glicosídica<sup>2</sup>. Es decir que siempre existía la secuencia Asn-X-Ser(Thr). Se vio que esta secuencia era necesaria pero no suficiente para determinar que existiera una unión glicosídica. Algunos estudios establecieron una determinada estructura secundaria en esta región de la proteína, la de

"vuelta  $\beta$ "<sup>31</sup>. Así, los sitios de glicosilación se encuentran en las regiones externas, expuestas de las cadenas peptídicas<sup>32</sup>.

### 1.7.b) OLIGOSACARIDOS DE TIPO "COMPLEJO":

Una secuencia comunmente presente en este tipo de oligosacárido es la lactosamina  $\text{Gal} \xrightarrow{\beta 1-3} \text{GlcNAc}$ . También es común la secuencia:  $\text{SA} \xrightarrow{\alpha 2-6} \text{Gal} \xrightarrow{\beta 1-3} \text{GlcNAc} \xrightarrow{\beta 1-3} \text{Man}$  <sup>32</sup>. La variedad de estructuras encontradas hasta el momento es enorme<sup>34</sup>. La estructura general es la de la figura 8.

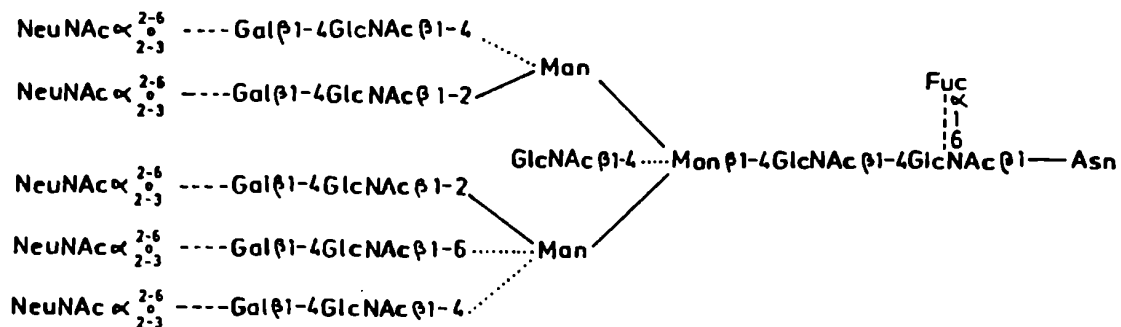


Fig. 8. Estructura general de oligosacáridos con unión N-glicosídica de tipo "complejo". Los fragmentos o residuos unidos por línea punteada no son de presencia obligatoria.

Como se ve pueden existir hasta 5 "antenas" llamándose así a las ramificaciones de las manosas y también puede haber una GlcNAc unida a la 1<sup>er</sup> manosa llamándose la GlcNAc bisectante. Esta última tiene su importancia ya que determina la estructura terciaria final del oligosacárido, favoreciendo la conformación "pájaro" en relación a las otras (fig. 9) y por lo tanto estableciendo un determinado recubrimiento espacial de la

proteína. En el caso de las tetra-antenarias, por ejemplo, el área cubierta es de alrededor de  $2000 \text{ \AA}^2$ , pudiendo por lo tanto envolver completamente a la proteína<sup>30</sup>.

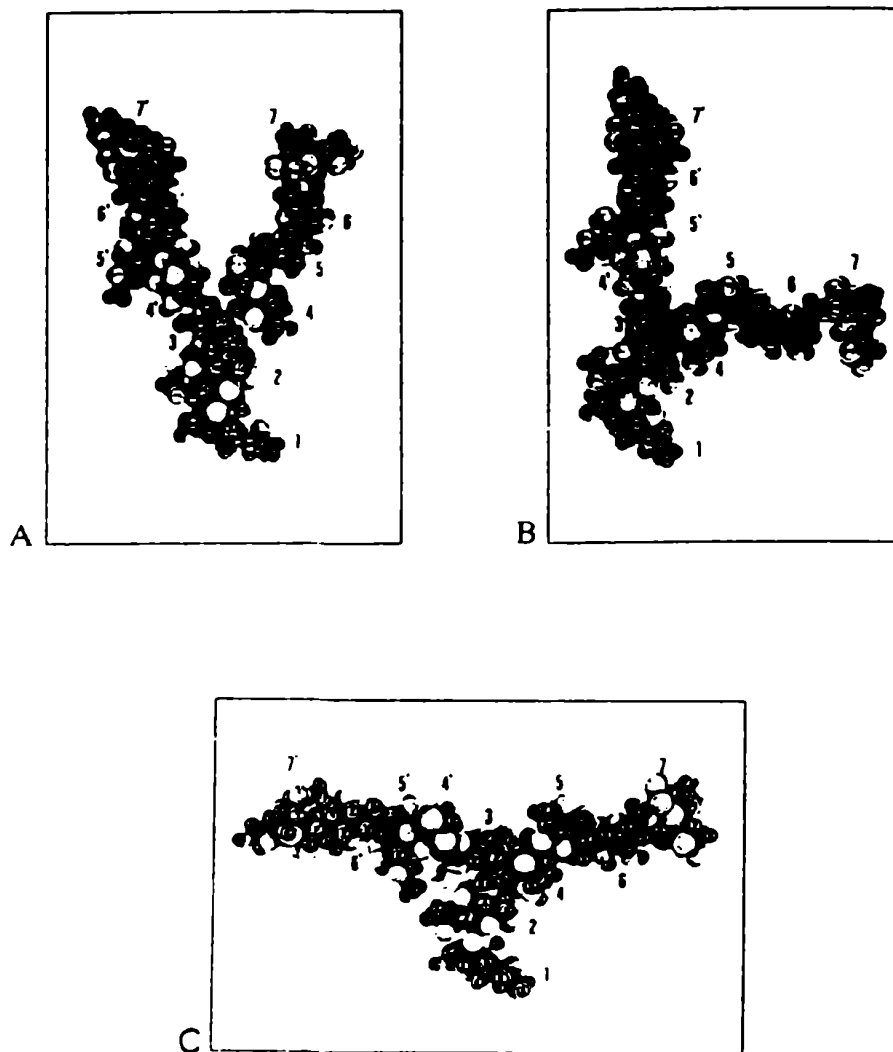


Fig. 9. Tres de las conformaciones posibles para oligosacáridos de tipo "complejo" biantenarios. A. Conformación "Y". B. Conformación "T". C. Conformación "pájaro". <sup>30</sup>

El número de oligosacáridos de tipo complejo por molécula de proteína puede variar grandemente, de 1 a más de 30 por molécula<sup>14</sup>.

Es importante señalar que no se han encontrado oligosacáridos de tipo complejo en eucariotes inferiores (plantas, hongos, protozoarios) salvo en tripanosomátidos<sup>34</sup>. En microorganismos y plantas existen sólo oligosacáridos del tipo polimánosa.

#### 1.7.c) OLIGOSACARIDOS DE TIPO "SIMPLE" O "POLIMANOSA":

Se denominaron oligosacáridos de tipo simple primeramente a los que estaban constituidos sólo de manosa y N-acetilglucosamina<sup>14</sup>. Luego se extendió esta denominación a los oligosacáridos sensibles a tratamiento con endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa H (Endo H). (Esta enzima como veremos más adelante corta entre las dos N-acetilglucosaminas del extremo reductor de los oligosacáridos). Así se incluyeron en este grupo oligosacáridos que contienen sustituyentes fosfato como los presentes en las enzimas lisosomales<sup>37</sup>; con sustituyentes sulfato como los existentes en keratan sulfato<sup>38</sup> o en glicoproteínas de células de riñón bovino<sup>39</sup>; oligosacáridos con GlcNAc en los extremos no reductores<sup>40</sup>; oligosacáridos con fucosa y xilosa como en la bromelina de ananá<sup>41</sup>; con galactosa<sup>42</sup>; etc.

Por otro lado se encontró que la Endo H incluso corta oligosacáridos del tipo híbrido<sup>43</sup> (fig. 7). Las características definitorias para oligosacáridos de tipo "polimánosa" serían en definitiva la presencia de mas de 3 residuos de manosa y la ausencia de ácido siálico.

Como se mencionó anteriormente este tipo de estructuras se encuentra en plantas<sup>44</sup>, hongos<sup>45</sup>, levaduras<sup>46</sup>, y otros eucariotes inferiores. En el caso de hongos se encuentran

verdaderos polisacáridos (150 unidades de manosa por molécula), los mananos, unidos a asparagina; de ellos hablaremos en la sección II.

En eucariotes superiores también son muchas las glicoproteínas con oligosacáridos del tipo "polimánosa", incluso preponderantes en algunos tejidos, como por ej. la ovoalbúmina en oviducto de gallina <sup>47</sup> o la tiroglobulina en tiroides de mamíferos <sup>48</sup>. La variedad estructural en oligosacáridos de este tipo es también enorme <sup>49</sup>.

#### I.7.d) OLIGOSACARIDOS DE TIPO "HÍBRIDO":

Los oligosacáridos de tipo "híbrido" comparten características de los dos grupos anteriores. Tienen un *núcleo* de más de 3 manosas, pero también poseen una *antena* con sialil-lactosamina, lactosamina o GlcNAc (fig. 7), como en las glicoproteínas aisladas por Kornfeld de macrófagos de ratón <sup>43</sup>.

Se estudiaron una diversidad de estructuras de este tipo, presentes en eucariotes superiores, por ej. en la rodopsina <sup>50</sup> o en la ovoalbumina <sup>42</sup>. En esta última se encuentran diversas estructuras con GlcNAc en los extremos no reductores. Según nuestra definición anterior estas podrían ser del tipo "polimánosa" pero se las llamó "híbridas" para diferenciarlas de las estructuras de tipo  $\text{Man}_n\text{GlcNAc}_2$  (*simples*) que son las preponderantes.

#### I.8. PRESENCIA DE DIVERSOS TIPOS DE OLIGOSACARIDO EN UNA MISMA GLICOPROTEÍNA:

Pueden coexistir en una misma glicoproteína oligosacáridos de más de un tipo. Esto ha sido bien determinado para las inmunoglobulinas, por ej. las del tipo IgM <sup>51</sup>, en que

coexisten oligosacáridos del tipo "polimannosa" y "complejo". Esto se cumple para muchas otras glicoproteínas<sup>52</sup>.

También son comunes glicoproteínas con cadenas N-glicosídicas y O-glicosídicas coexistentes en la misma molécula<sup>14</sup>.

Esta presencia de varios tipos de oligosacárido a la vez hace que los estudios de estructura e incluso los de biosíntesis sean bastante complejos.

### 1.9. MICROHETEROGENEIDAD:

La microheterogeneidad se refiere a pequeñas diferencias de estructura de los oligosacáridos de distintas moléculas de una misma glicoproteína<sup>53</sup>. Incluso se ha demostrado que existe microheterogeneidad para oligosacáridos de un mismo sitio de glicosilación en una glicoproteína<sup>40</sup>. En catepsina D de hígado porcino existe sólo un sitio de glicosilación<sup>52</sup>. Por lo tanto la microheterogeneidad es obligadamente en este sitio. Al existir más de 1 sitio se deben analizar por separado. Esto se ha hecho por separación de los glicopéptidos correspondientes a cada sitio, como en el caso de la glicoproteína de histocompatibilidad de ratón (H-2K<sup>b</sup>)<sup>54</sup>.

La microheterogeneidad puede reflejar una variedad de especies en cada célula o una variedad al juntar especies únicas (o escasas) de muchas células de un tejido. Este último es el caso de la molécula de adhesión celular neuronal (NCAM) cuyas diversas funciones de adhesión estarían reguladas por la modulación de la microheterogeneidad de su porción oligosacáridica<sup>55</sup>.



## **I.10. AISLAMIENTO Y DETERMINACION ESTRUCTURAL:**

### **I.10.a) AISLAMIENTO Y SEPARACION DE GLICOPEPTIDOS:**

El primer paso para determinar la estructura de los oligosacáridos es degradar la proteína obteniendo glicopéptidos. Esto se puede realizar con una proteasa como la pronasa, en forma exhaustiva. Si se quiere, sin embargo, determinar en que región de la proteína está unido el oligosacárido, se puede como primer paso producir fragmentos peptídicos con CNBr, tripsina, subtilisina u otras proteasas y separar esos fragmentos por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en fase reversa<sup>54</sup>.

Para separar los glicopéptidos se han utilizado varios métodos: filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico<sup>40</sup>, electroforesis en papel; en los últimos tiempos se vienen reemplazando estos métodos por HPLC de intercambio iónico, de fase reversa, como señalamos antes, o de filtración molecular. Por este sistema cromatográfico se obtienen separaciones mejores en tiempos mucho más breves<sup>54</sup>.

Se pueden separar glicopéptidos y/o glicoproteínas de acuerdo a la estructura de la porción sacarídica. Para ello se han utilizado en los últimos años muchas lectinas, las cuales se ligan covalentemente a una matriz de sepharosa o agarosa. A través de columnas llenas con esta fase ligada se cromatografían los glicopéptidos eluyéndolos selectivamente con metil glicosidos. Algunas de las lectinas mas usadas son concanavalina A (ConA), lectina de arveja, fitohemoaglutinina de lenteja (PHA), aglutinina de germen de trigo (WGA), etc. En un principio se asociaba a cada lectina una afinidad con uno o más monosacáridos<sup>57, 58</sup>; en realidad la afinidad por la lectina depende de las sustituciones del monosacárido en el oligosacárido y en

definitiva de la estructura general del oligosacárido<sup>20</sup>. Es muy rápido y efectivo el método de separación por varias columnas de lectinas diferentes en serie<sup>34,40</sup>.

#### 1.10.b) TIPO DE ENLACE - SEPARACION DE LA PORCION SACARIDICA:

Cada tipo de enlace que describimos en la sección 1.4 es lábil en diferentes condiciones de reacción; aplicando estas condiciones se puede liberar el oligosacárido y determinar su tipo de unión al aminoácido.

Los azúcares unidos a serina o treonina son lábiles a  $\beta$ -eliminación. Este es un tratamiento alcalino suave por el cual el hidrógeno en  $\beta$  a la unión glicosídica, que tiene carácter ácido, se elimina provocando un desplazamiento electrónico por el cual se libera el azúcar. Esto no ocurre si el  $-NH_2$  o el  $-COOH$  en  $\alpha$  están libres y por lo tanto el hidrógeno está estabilizado por la mayor densidad electrónica. Es decir, en aminoácidos terminales las condiciones deben ser más severas. Para evitar la degradación del oligosacárido por "peeling" (oxidación a partir del extremo reductor libre), se realiza la reacción en condiciones reductoras, en presencia de  $NaBH_4$ , por ej.: 0,05 N NaOH a 45°C durante 12 a 30 hs. en presencia de 1,0 M  $NaBH_4$ <sup>41</sup>.

Las uniones de azúcares a hidroxiprolina o hidroxilisina son muy resistentes al tratamiento alcalino (2 N NaOH a 105 °C por 24 hs.)<sup>27</sup>; en cambio son lábiles al ácido (2 N HCl a 110°C por 30 min.).

Las uniones N-glicosídicas a asparagina se pueden romper por un tratamiento fuerte en medio alcalino (2 N NaOH/1 M  $NaBH_4$  a 100°C por 4 a 6 hs.)<sup>42</sup>; (siempre se debe trabajar en condiciones reductoras para evitar el "peeling"). También se rompen por hidrazinólisis ( $H_2NNH_2$  a 100°C por 30 hs.)<sup>43</sup>.

Este último tratamiento no afecta uniones O-glicosídicas.

El método más eficiente para romper uniones N-glicosídicas es el tratamiento con enzimas específicas que se han aislado en los últimos años<sup>134</sup>. Estas se pueden dividir en dos clases principales: Las que rompen la unión entre la asparagina y la N-acetilglucosamina, y las endo- $\beta$ -N-acetil glucosaminidasas que cortan la unión entre las N-acetil glucosaminas de la N,N'-di-N-acetilquitobiosa del extremo reductor del oligosacárido. Hay varias enzimas de este tipo. Las primeras que se encontraron funcionaban en general con estructuras del tipo "polimansa"; sin embargo se encontró recientemente que la más comunmente usada, la Endo H, corta también oligosacáridos aniónicos del tipo híbrido<sup>43</sup>. Recientemente se aisló la llamada Endo F, de *Flavobacterium meningosepticum*, que corta todo tipo de oligosacáridos, incluso los del tipo "complejo"<sup>44</sup>. Usando unas u otras podemos tener un rápido diagnóstico del tipo de oligosacárido con el que estamos tratando.

#### I.10.c) ESTRUCTURA DEL OLIGOSACARIDO:

Una vez separado el oligosacárido de la proteína es necesario separarlo de otros oligosacáridos presentes. Para esto se pueden separar por tamaño por filtración molecular<sup>45</sup> o por cromatografía en papel. También se pueden separar por características estructurales, por ejemplo por electroforesis en papel en buffer borato de sodio<sup>46</sup>. El borato se compleja en forma diferente dependiendo de los azúcares presentes y sus uniones. Otro modo de separación por características estructurales es mediante cromatografía en columnas de lectinas ligadas a agarosa como mencionamos antes para glicopéptidos. Estos métodos se vienen reemplazando progresivamente en los últimos años por HPLC<sup>44</sup>.

Una vez aislado el oligosacárido, el método tradicional para determinar su estructura es por degradaciones químicas y enzimáticas.

La degradación secuencial con exo-glicosidasas permite determinar no sólo la secuencia de monosacáridos desde el extremo no reductor sino también la anomería de estos. Comunmente se usa neuraminidasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa,  $\alpha$ -manosidasa, etc.<sup>47</sup>.

Otro método es la fragmentación del oligosacárido por métodos químicos: hidrólisis ácidas suaves liberan ácido siálico, fucosa u otros desoxiazúcares, furanosas, pentosas.

Por tratamiento de acetólisis controlado se rompen selectivamente uniones 1 $\rightarrow$ 6 <sup>48</sup>. Podemos luego estudiar la sustitución y secuencia de cada uno de estos fragmentos y luego armar el "rompecabezas".

Para obtener fragmentación y también para determinar la sustitución de cada residuo es muy útil la degradación con periodato (que rompe la unión entre carbonos vecinos con hidroxilos no sustituidos), seguida de reducción con NaBH<sub>4</sub> e hidrólisis ácida suave para romper los acetales formados. Esta es la llamada *degradación de Smith*<sup>49</sup>.

Por análisis de metilación obtenemos la mejor información sobre la sustitución de cada residuo<sup>70</sup>. El método más establecido es el de Hakomori<sup>71</sup>. Por este método se realiza permetilación en una sola etapa con ICH<sub>3</sub> y metilsulfinil carbanión. Luego se realiza una hidrólisis ácida parcial o total. Los productos de la hidrólisis se pueden separar por cromatografía en capa delgada (TLC) o HPLC<sup>72,73</sup>. Los productos pueden también reducirse con NaBH<sub>4</sub> y acetilarse para luego analizar los acetatos de alditol derivatizados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa<sup>74</sup>.

Estos métodos degradativos están siendo completamente

reemplazados en los últimos años por métodos espectroscópicos, mucho más rápidos y más exactos. Tal vez el método espectroscópico más útil es la resonancia magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  de alta resolución. Las señales que se obtienen de los distintos protones de los azúcares en un oligosacárido son a frecuencias muy parecidas debido al entorno químico similar. Pero con el advenimiento de aparatos con electroimanes enfriados superconductores funcionando a frecuencias de 360 o 500 MHz se logran separar las señales de los protones del carbono anomérico y de la mayoría de los otros carbonos de los distintos residuos y así, comparando con tablas hechas con los standards adecuados, se puede determinar rápidamente la estructura completa de un oligosacárido<sup>70,74</sup>. En una sustancia homogénea la intensidad a las distintas resonancias aparece en relaciones enteras, mientras que relaciones no enteras denotan una mezcla de estructuras o heterogeneidad. Así podemos determinar con RMN de  $^1\text{H}$  estructuras en mezclas eliminando la necesidad de mayor purificación<sup>53</sup>.

Aunque menos usada hasta ahora, la RMN de  $^{13}\text{C}$  promete ser una herramienta tanto o mas útil que la de  $^1\text{H}$  <sup>77</sup>. Para oligosacáridos con residuos fosforilados es útil la RMN de  $^{31}\text{P}$ .

Otro método que promete una gran utilidad en el estudio de oligosacáridos es la espectrometría de masa de bombardeo atómico rápido (FAB-MS) que da menos fragmentaciones que la de bombardeo electrónico y permite trabajar con moléculas de alto peso molecular <sup>78,79</sup>.

Para estudiar la estructura tridimensional y la conformación de los oligosacáridos es útil la espectroscopía de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano <sup>80,81</sup>.

Debemos hacer notar que si bien se ha ido reduciendo progresivamente la masa necesaria para estudiar un compuesto por

métodos espectroscópicos, todavía se está lejos de la masa obtenible en general de intermediarios biológicos. Por ejemplo, en RMN de  $^1\text{H}$  de alta resolución y utilizando acumulación de pulsos con transformada de Fourier se puede utilizar en estos momentos un mínimo de 10  $\mu\text{g}$  del oligosacárido estudiado; si se trata de un intermediario biosintético podemos aislar generalmente sólo en el orden de los nanogramos trabajando en condiciones normales. En los estudios encarados en esta Tesis se han utilizado por lo tanto los tradicionales métodos de degradación química y enzimática de intermediarios biosintéticos marcados radioactivamente.



## II. GLICOPROTEINAS EN HONGOS

### OLIGOSACARIDOS UNIDOS N-GLICOSIDICAMENTE DEL TIPO MANANO

#### II.1. SACCHAROMYCES CEREVISIAE:

De los hongos, el mejor estudiado en cuanto a sus macromoléculas es sin duda *Saccharomyces cerevisiae*. Al hablar de sus glicoproteínas generalmente se las relaciona con la pared celular, ya que muchas de ellas forman parte de su estructura. Los tres polímeros principales de la pared de *S.cerevisiae* son glucano, quitina y manano.

El principal glucano es un polímero de glucosas unidas  $\beta 1 \rightarrow 3$  con un 3% de uniones  $\beta 1 \rightarrow 6$  <sup>22</sup>. También existen, aunque en mucho menor proporción, glucanos con mayor porcentaje de uniones  $\beta 1 \rightarrow 6$  <sup>23, 24</sup>.

La quitina, (poli-N-acetilglucosamina con uniones  $\beta 1 \rightarrow 4$ ), es un componente principal en hongos micelares, pero en *S.cerevisiae*, así como en otras levaduras, es un componente menor restringido a la región del nacimiento de los brotes <sup>25</sup>.

El manano era considerado por muchos años un polisacárido ya que con los métodos de extracción y aislamiento (álcali a ebullición) <sup>26</sup> se rompían las uniones a proteína (ver sección I.10.b). Por un procedimiento mucho más suave de aislamiento con buffer citrato <sup>27</sup>, se pudo extraer la estructura completa del manano unido a proteína, que fue muy estudiado por el equipo de Ballou <sup>28</sup>. El manano posee dos tipos de uniones a proteína: 1) A serina o treonina se unen oligosacáridos cortos de manosa, de 1 a 4 unidades. (fig. 4). 2) A asparagina se une una estructura del tipo "polimanosa" (ver sección 1.7.c), llamada "núcleo



interno" ( *inner core* ), sobre la cual crece una cadena de 50 a 150 manosas con unión  $\alpha$  (fig. 4), llamada "cadena externa" ( *outer chain* ). Las uniones fosfodiéster en las cadenas externas también eran hidrolizadas con los métodos de extracción alcalina y se perdían <sup>20</sup>. El "núcleo interno" fue estudiado luego de digerir la cadena externa con una endo- $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6)manosidasa<sup>24</sup>, quedando algunas indeterminaciones. Sólo recientemente se determinó fehacientemente la estructura del "núcleo interno", estudiando mutantes que no producían "cadena externa", y se vio que la estructura era idéntica a los intermediarios biosintéticos del procesamiento de oligosacáridos del tipo "polimano" <sup>20, 21</sup>.

Se debe entender al "manano" como una estructura general que tienen muchas glicoproteínas. Numerosas enzimas de *S. cerevisiae* se encuentran en la pared o el espacio periplásmico y tienen oligosacáridos con estructuras del tipo manano; existe una variación entre ellas con respecto al largo de las cadenas sacarídicas. La más estudiada es la invertasa (o  $\beta$ -fructofuranosidasa). Esta enzima es un dímero de PM 270.000 y posee unas 20 cadenas de oligosacárido unidas a asparagina que pueden tener de 25 a 50-60 unidades de manosa <sup>22</sup>, aunque varias de las cadenas sólo poseen el núcleo interno<sup>23</sup>. No está claro si posee cadenas O-glicosídicas<sup>24</sup>. Otra enzima muy estudiada es la carboxipeptidasa Y. En este caso los oligosacáridos N-glicosídicos son mucho más cortos (Mane- $\rightarrow$ 3GlcNAc $\rightarrow$  y algunos con fosfato) (fig. 10) <sup>25</sup>. Otras enzimas con cadenas de "polimano" son ATPasa<sup>26</sup>, fosfatasa ácida<sup>27</sup>. Otras enzimas de este tipo que participan de la estructura de la pared celular (porque se solubilizan al preparar esferoplastos y su curva de pH es similar *in vivo* a la de la enzima aislada estudiada *in vitro*), son: melibiasa, glucoamilasa,  $\alpha$ -amilasa, inulinasa, trehalasa, catalasa, aril- $\beta$ -glucosidasa <sup>28</sup>.

-33-

Las glicoproteínas de tipo "manano" están interconectadas con otros componentes de la pared celular, formando una red. Está descrito un enlace del glucano ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) al manano mediante una unión fosfato<sup>99</sup>. Al mismo tiempo hay evidencias de unión entre quitina y glucano<sup>100</sup>. Mientras que el glucano y la quitina forman estructuras fibrilares localizadas, los mananos aparentan tener una disposición amorfa, cubriendo los otros polímeros<sup>99</sup>.

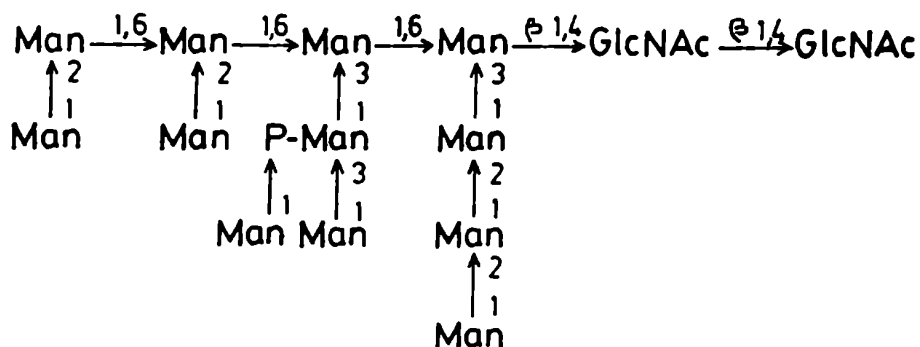


Fig. 10. Oligosacárido con unión N-glicosídica de carboxipeptidasa y conteniendo fosfato.

## II.2. OTROS HONGOS:

### MANANOS SUSTITUIDOS:

Los glicoconjugados con estructuras de tipo manano son en general componentes abundantes de la pared celular de células levaduriformes: *Saccharomycetaceae*, *Cryptococcaceae*, *Sporobolomycetaceae*, *Rhodotorulaceae*<sup>101</sup>. Los mananos de las distintas levaduras difieren principalmente en su ramificación. En un estudio de Kocourek y Ballou, éstos vieron que por acetólisis (que

rompe las uniones 1→6 de la cadena principal del manano), se obtenían para el manano de *S.cerevisiae* manobiosa, manotriosa y manotetraosa correspondientes a las ramificaciones (ver fig. 4) y algo de manosa proveniente de residuos no ramificados. En cambio en *Kluveromyces brevis* obtuvieron sólo manosa, manobiosa y manotriosa; en *Saccharomyces lactis* obtuvieron además manopentaosa; en *Candida albicans* y otras del género obtuvieron manopentaosa, manohexaosa y manohexaosa; etc.<sup>100</sup>.

También se pueden encontrar ejemplos de mananos lineales: por ej. en *Hansenula capsulata* se encuentra la estructura repetitiva  $\alpha$  D-Manp(1→2)  $\alpha$  D-Manp(1→2)  $\alpha$  D-Manp(1→6) → <sup>102</sup>. En *Rhodotorula glutinis* existe la estructura repetitiva :  $\beta$  D-Manp(1→3)  $\beta$  D-Manp(1→4) → <sup>103</sup>. Como vemos, en este caso se trata de un manano con uniones  $\beta$  que son bastante raros.

En hongos micelares también existen mananos, aunque en general llevan diversos sustituyentes, por lo cual se los clasifica como heteromananos. Los más comunes son los fosfomananos, por ej. en *Hansenula capsulata* con la estructura repetitiva de la figura 11 <sup>104</sup>.

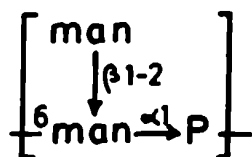


Fig. 11. Unidad repetitiva del fosfomanano de *Hansenula capsulata*.

También son comunes los galactomananos, como en *Aspergillus niger*<sup>105</sup> y en otras especies del género *Aspergillus*<sup>106</sup>, donde la cadena principal tiene uniones  $\alpha$  1→6 y cadenas laterales de manosa  $\alpha$  1→2 con galactosa unida en  $\beta$ .

También son comunes las galactosas unidas en  $\alpha$  como en *Candida lipolytica*<sup>107</sup> o en *Trichosporon fermentans*<sup>108</sup>. Hay descritos también galactomananos con la galactosa en forma furanósica en *Ascobolus*<sup>12</sup>, y en *Penicillium charlesii*<sup>109</sup>.

Otros sustituyentes conocidos son: ramnosa como en varias especies de *Ceratocystis* o *Graphium*<sup>110</sup> o en *Sporothrix schenkii*<sup>111</sup>; glucosa como en varias especies de *Ceratocystis*<sup>112</sup> o en *Rhodotorula glutinis*<sup>113</sup>; fucosa como en *A. cylindrospora*<sup>114</sup>. En *Cryptococcus neoformans* se encuentra un galactoxilomanano y un glucuronoxilomanano<sup>115</sup>. Pueden ocurrir sustituyentes acetato como en *Tremella mesenterica*<sup>116</sup>. N-acetilglucosamina se encuentra en muchos mananos en extremos no reductores, por ej. en *Saccharomyces phaseolosporus* o en *Pichia bovis*<sup>117</sup>.

Es importante destacar que si bien la mayoría o todos estos mananos deben estar unidos a proteína, generalmente no se estudió este hecho, debido probablemente a los métodos de aislamiento que destruían la unión a la proteína. Para una revisión amplia sobre polisacáridos de hongos se recomienda el trabajo de E.Barreto-Bergter y P.A.J. Gorin<sup>118</sup>.

Aunque se han estudiado muy profusamente en hongos, también se encuentran moléculas de este tipo en líquenes<sup>119</sup>, algas<sup>119</sup>, y plantas<sup>120</sup>.

Los mananos y heteromananos con unión N-glicosídica a proteína constituyen por lo tanto un tipo de oligo-(poli)-sacaridos claramente diferenciado de los del tipo "polimanosa" y "complejo" vistos en la sección I.7. Si bien hay bastantes estudios acerca de sus estructuras muy poco se sabe, como veremos en el siguiente capítulo, de su biosíntesis.

•

•

•

-

•

•

### III. GLICOSILACION DE PROTEINAS

#### III.1. UNION O-GLICOSIDICA:

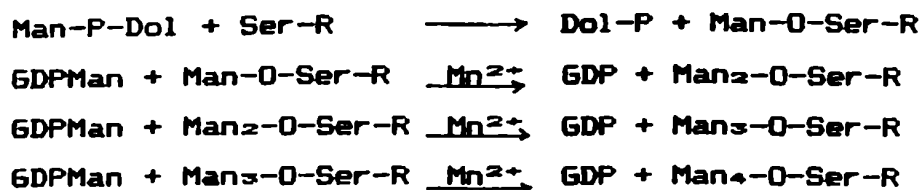
Como el estudio encarado en esta Tesis se refiere a oligosacáridos con unión N-glicosídica, no nos extenderemos en el análisis de la O-glicosilación de proteínas. Es importante, sin embargo, destacar que en la O-glicosilación la transferencia de azúcar al aminoácido ocurre directamente a partir del nucleotido-azúcar correspondiente, al igual que en el posterior crecimiento de las cadenas. Este crecimiento se realiza agregándose residuos sobre el extremo no reductor<sup>121</sup>. La única excepción encontrada hasta ahora es en la síntesis de las cadenas O-glicosídicas de manoproteínas de *S.cerevisiae* y otros hongos en la que intervienen intermediarios lípido-azúcares.

Las glicosiltransferasas involucradas se encuentran en el aparato de Golgi y las glicoproteínas en que mejor se ha estudiado el mecanismo son las mucinas de glándulas submaxilares y las glicoproteínas de grupo sanguíneo, en las que la unión a proteína es a través de GalNAc-O-Ser/Thr<sup>122</sup>. También ha sido bastante estudiada la síntesis de la heparina. En este caso se transfiere xilosa a partir de UDP-Xil para formar la unión Xil-O-Ser<sup>123</sup>. El agregado de otros residuos a la cadena y su modificación posterior están descriptos por Roden et al.<sup>124</sup>.

#### Man-O-Ser/Thr:

Como mencionamos antes, este tipo de unión es producida con intervención de un lípido-azúcar: dolicol-fosfato-manosa. (Man-P-Dol)<sup>125,126</sup>. En la próxima sección hablaremos más del dolicol y de dolicol-P-monosacáridos. En manoproteínas de

*S.cerevisiae* se encuentran unidas O-glicosidicamente a serina o treonina manosa, manobiosa, manotriosa y manotetraosa. (ver fig. 4). Estas se sintetizan de acuerdo a las siguientes reacciones: <sup>33</sup>



De estas reacciones la primera ocurre en el retículo endoplásmico, mientras que la adición de las demás manosas ocurre en el aparato de Golgi <sup>127</sup>.

Este mecanismo también ocurre en mananos de otros hongos, por ej., *Hansenula holstii*<sup>128</sup>, *Neurospora crassa*<sup>129</sup>, *Aspergillus niger*<sup>130</sup>.

### III.2. UNION N-GLICOSIDICA:

#### III.2.a) Biosíntesis de oligosacáridos ligados N-glicosidicamente a proteína en mamíferos:

Desde que se descubrió la intervención de lípido-azúcares como intermediarios en la biosíntesis de glicoproteínas, a principios de la década de 1970 <sup>131-133</sup>, muy numerosos grupos iniciaron estudios en este tema, habiéndose hasta hoy acumulado muchísima información. Son varias y muy completas las revisiones aparecidas sobre este tema en los últimos años <sup>33, 41, 134-141</sup>. Nos limitaremos por lo tanto a elaborar un resumen de la información que se tiene actualmente sobre el mecanismo de N-glicosilación.

Tal vez sea útil presentar el esquema general de la

N-glicosilación para después ir detallando sus partes: En la figura 12 vemos la cadena de eventos que se inicia en el retículo endoplásmico rugoso (RER). El primer paso es la síntesis del lípido-oligosacárido intermediario que no se ilustra en la figura 12 y que veremos luego. El oligosacárido se transfiere en bloque a la proteína nascente, es decir que la glicosilación es simultánea a la síntesis de la proteína. A continuación comienza el llamado "procesamiento": se pierden primeramente las glucosas. Todavía en el RER pueden perderse 1 o 2 manosas, transfiriéndose luego una glucosa a los productos a partir de UDPGlc. Esta glucosa se vuelve a perder y por eso se llamó a esta etapa glucosilación transitoria <sup>142</sup>. En el caso de los oligosacáridos de tipo "polimansosa" esta puede ser la última etapa del procesamiento, o pueden perderse algunas manosas más. Para los de tipo "complejo" o "híbrido", en el aparato de Golgi se pierden más manosas hasta quedar un total de 3 y se adicionan nuevos azúcares: fucosa, N-acetilglucosamina, galactosa, ácido siálico, todos a partir de los nucleótido-azúcares correspondientes.

### III.2.a.1) Dolicol-P-P- oligosacárido intermediario:

En 1972 Parodi et al <sup>133</sup> describieron la síntesis de un oligosacárido unido a dolicol que se podía transferir a proteína en microsomas de hígado de rata. A partir de ese momento numerosos grupos comenzaron a estudiar diversos sistemas y arribaron a la conclusión de que el intermediario era en todos los casos el mismo y sólo difería en el tamaño de la porción lipídica, como veremos más adelante. El intermediario  $\text{Glc} \rightarrow \text{Man} \rightarrow \text{GlcNac}_2 - \text{P-P-dolicol}$  se sintetizaba por ejemplo en células CHO<sup>72</sup>, en fibroblastos de embrión de pollo<sup>143</sup>, en *S.cerevisiae*<sup>144</sup>. En la figura 13 se detalla la estructura de la porción sacarídica<sup>72</sup>.



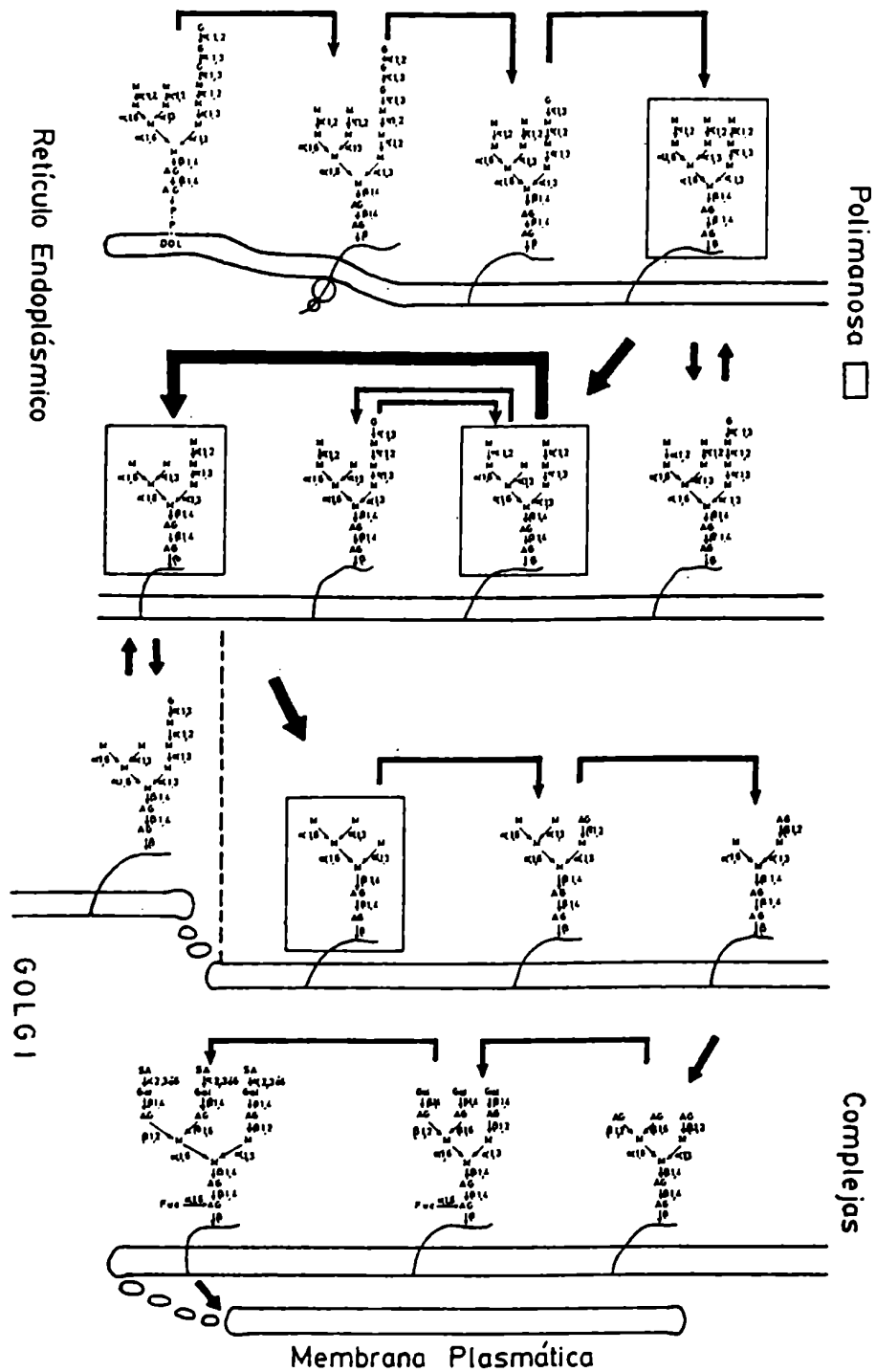


Fig. 12. Transferencia y procesamiento de oligosacáridos con unión N-glicosídica a proteína en mamíferos. El orden de salida de residuos de manosa ilustrado no es el único posible. Existe mucha variedad estructural en oligosacáridos "complejos"; para la entrada de galactosa no es necesaria la presencia de los tres residuos de N-acetilglucosamina. Del mismo modo no son necesarios los tres de galactosa para la entrada de ácido siálico. M= manosa, G= glucosa, P= fosfato, AG= N-acetilglucosamina, SA= ácido siálico.

-41-

Sólo recientemente se describieron intermediarios diferentes (no glucosilados) en la familia de los tripanosomátidos 145-147, como veremos más adelante.

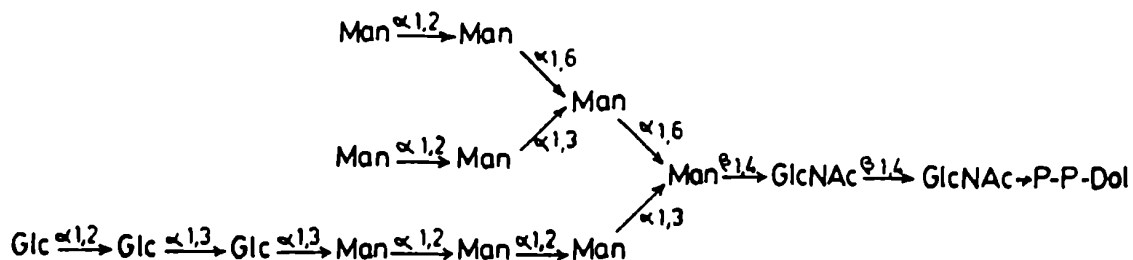


Fig. 13. Estructura del dolicol-P-P-oligosacárido, intermediario en la N-glicosilación de proteínas en mamíferos.

### III.2.a.11) Dolicol:

En la figura 14 vemos el camino de la biosíntesis de dolicol y de sus principales derivados. Dolicol es un nombre generico para indicar poliprenoles de 55 a 110 carbonos, con la unidad  $\alpha$ -isoprenoide saturada (figura 15). Aunque en cada organismo hay una gama de tamaños de dolicol, siempre existe una especie predominante. Bajando en la escala evolutiva es cada vez menor el tamaño predominante del dolicol: mamíferos: 19 unidades isoprenoides 148, insectos: 18 149, *S.cerevisiae*: 17 150, *Tetrahymena*: 13 151, *Trypanosoma cruzi*: 13 144, *Chritidia fasciculata*: 11 152. La concentración celular de Dolicol-P parece ser un importante regulador de la glicosilación de proteínas 153, 154. Una parte muy pequeña del dolicol celular está en forma de Dol-P y mucho menos aún en la forma de

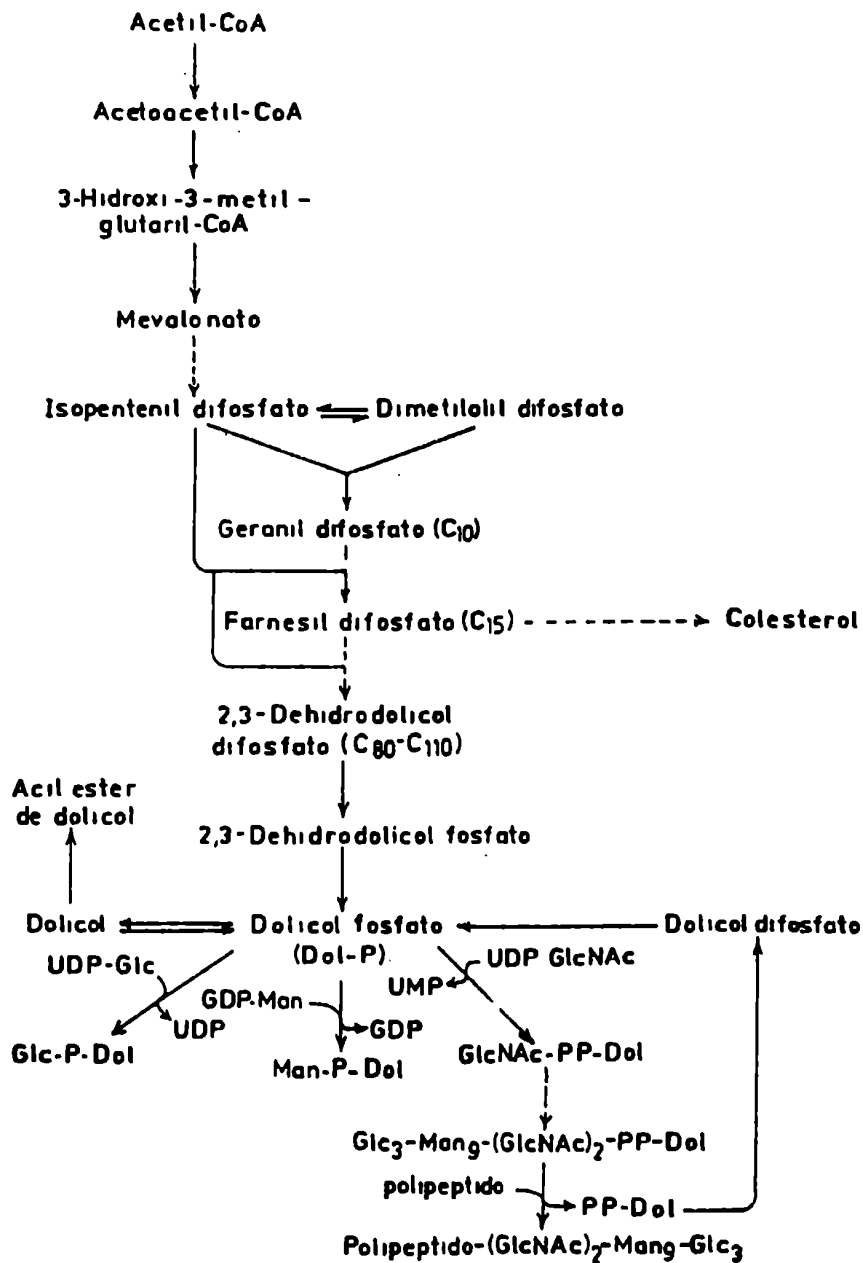


Fig. 14. Secuencia de reacciones en la BIOSINTESIS de DOLICOL FOSFATO y de AZUCARES UNIDOS A DOLICOL en mamíferos.

-43-

lípidido-azúcares intermediarios; la mayor parte está libre o esterificado con ácidos grasos.

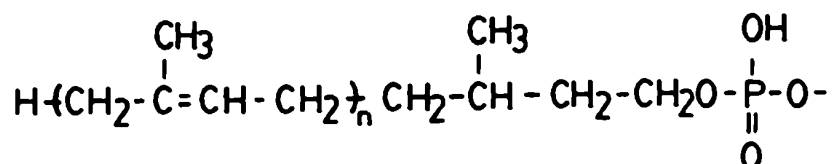


Fig. 15. Estructura del DOLICOL FOSFATO. n varía entre 18 para mamíferos hasta 10 para *Chritidia fasciculata*.

### III.2.a.iii) Síntesis del oligosacárido intermediario unido a dolicol:

En la figura 16 vemos el camino de la biosíntesis de  $\text{Glc}\rightarrow\text{Man}\rightarrow\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$  y la transferencia del oligosacárido a proteína. En el caso de células ayunadas se sintetiza  $\text{Glc}\rightarrow\text{Man}\rightarrow\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$  por falta de  $\text{Man-P-Dol}$  necesario para la transferencia de las últimas cuatro manosas <sup>125</sup>.

Se han encontrado una cantidad de análogos de azúcares y antibióticos que inhiben distintas etapas de la síntesis, y han posibilitado su estudio <sup>137, 138</sup>. Tal vez el más conocido sea la tunicamicina (fig. 17), que inhibe una etapa temprana en el ensamblado del lípido-oligosacárido: la transferencia de  $\text{GlcNAc-1-P}$  de  $\text{UDPGlcNAc}$  a  $\text{Dol-P}$  <sup>134</sup>.

### III.2.a.iv) Transferencia del oligosacárido a proteína:

Como señalamos en la sección 1.7.a, un requisito necesario aunque no suficiente en la estructura de la proteína para la transferencia del oligosacárido es la secuencia  $\text{Asn-X-Ser}$  (o

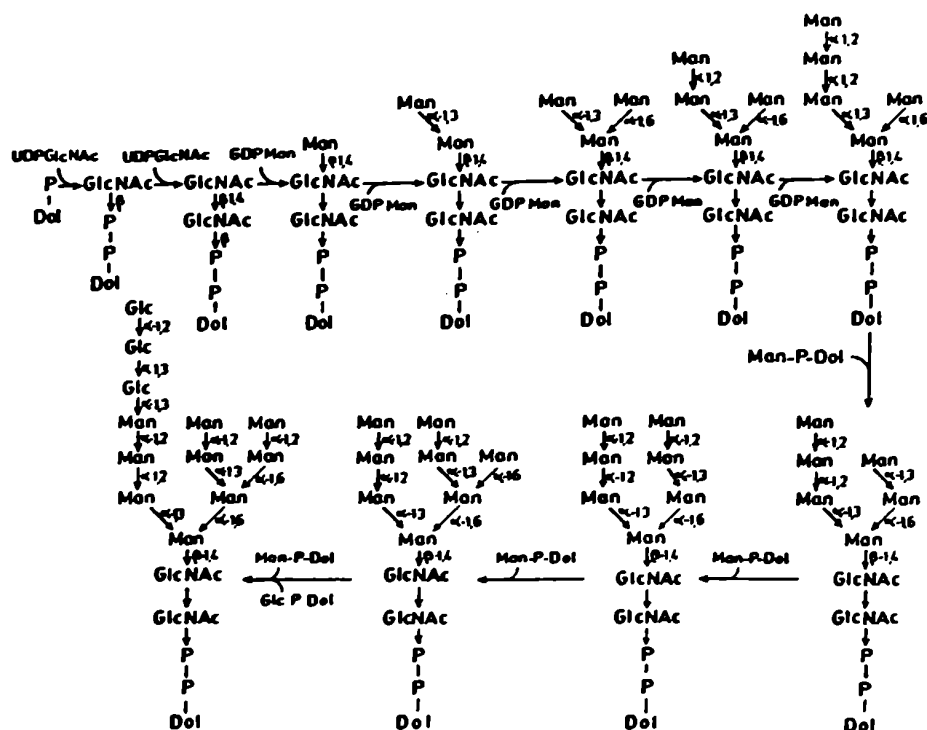
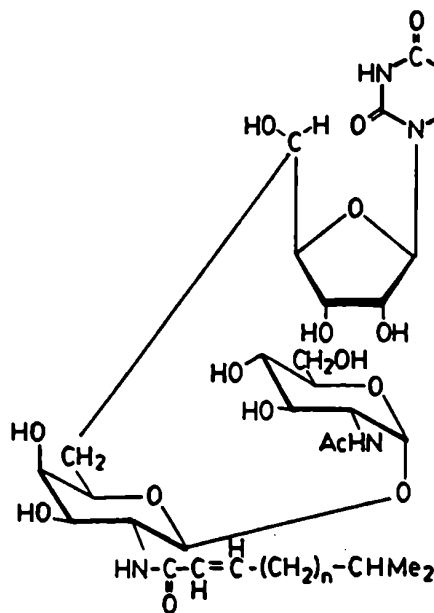


Fig. 16. Secuencia de reacciones en la BIOSINTESIS de  $\text{Glc-Man-GlcNAc}_2\text{-P-P-dolichol}$ , intermediario en la síntesis de oligosacáridos con unión N-glicosídica a proteína en mamíferos.

Thr). También es necesario que este dominio de la proteína esté expuesto (en una vuelta  $\beta$ ) 157,158.



Tunicamicina ( $n = 8, 9, 10$  o  $11$ )

Fig. 17. Estructura de la TUNICAMICINA.

Con respecto al oligosacárido parece ser una condición determinante la presencia de las tres glucosas. Se ha demostrado en fibroblastos NIL-B que la transferencia *in vitro* de oligosacáridos glucosilados era cuatro a nueve veces más rápida que la de intermediarios con oligosacáridos no glucosilados<sup>187</sup>. La transferencia es también mucho más eficiente con 3 glucosas que con 2<sup>140</sup>. Al descender en la escala evolutiva parece disminuir y hasta desaparecer la necesidad de las glucosas. Así, en *S.cerevisiae* es mucho menor la diferencia de velocidades de transferencia entre las formas glucosiladas y no glucosila-

das <sup>140</sup>. Finalmente, en tripanosomátidos el intermediario fisiológico no está glucosilado, como veremos luego.

### III.2.a.v) Procesamiento de oligosacáridos unidos N-glicosidicamente:

En la figura 12 vemos el esquema general del llamado "procesamiento". El primer paso, que ocurre apenas transferido el oligosacárido a la proteína es la salida de las glucosas. El proceso es muy rápido, la vida media de la reacción de escisión de la 1<sup>er</sup> glucosa *in vivo* es de unos 2 minutos en fibroblastos de embrión de pollo<sup>143</sup>. De la segunda es 5 minutos. De la tercera es bastante más larga, pero cuando se realizaron estos estudios cinéticos no se conocía el mecanismo de la glucosilación transitoria por la cual se debe considerar la salida y re-entrada de la última glucosa, como veremos más adelante. Las enzimas (glucosidasas) intervinientes son aparentemente dos y se encuentran en el RER y en menor proporción en el retículo endoplásmico liso<sup>141, 142</sup>.

Una vez perdidas las tres glucosas se pueden perder una o dos manosas por acción de  $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2 manosidasas que se encuentran en el RER<sup>143</sup>. Los oligosacáridos resultantes se glucosilan entonces, siempre a nivel de retículo endoplásmico<sup>142, 144, 145</sup>. Estas glucosas luego se vuelven a perder. Este mecanismo sería interesante para explicar la protección del oligosacárido al ataque de  $\alpha$ -manosidasa y por lo tanto la retención de la estructura de "polimánosa" y la no conversión en "compleja", protección que Hubbard adjudica a la conformación de la proteína <sup>144</sup>. Pero aparentemente glicoproteínas virales normalmente conteniendo oligosacáridos del tipo "complejo" también tienen intermediarios glucosilados Glc<sub>1</sub>Man<sub>6</sub> $\rightarrow$ GlcNAc<sub>2</sub>-Prot <sup>147</sup>.

Una vez en el aparato de Golgi (figura 12) se pueden per-

der las manosas con unión  $\alpha(1\rightarrow2)$ ; hay dos manosidasas  $\alpha(1\rightarrow2)$  descritas (Ia y Ib) <sup>149, 149</sup>. Así se llega a la estructura  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2\text{-Prot}$ . Aquí termina el procesamiento para estructuras del tipo "polimanosas". Para la síntesis de oligosacáridos de tipo "complejo" deben perderse todavía otras dos manosas. Antes de esto se transfiere un residuo de  $\text{GlcNAc}$  <sup>170</sup> y entonces sí actúa la manosidasa "tardía" (II) <sup>171</sup>. Sobre este producto se transfieren entonces  $\text{GlcNAc}$ ,  $\text{Gal}$ ,  $\text{NeuNAc}$ ,  $\text{Fuc}$ , para dar oligosacáridos "complejos".

Hay algunos caminos alternativos descritos aunque con evidencias poco firmes: Por estudios *in vitro* se encontró que se puede transferir quitobiosa o  $\text{GlcNAc}$  a la proteína a partir de  $\text{Dol-P-P-GlcNAc}_2$  o  $\text{Dol-P-P-GlcNAc}$ , y sobre ella transferirse directamente las manosas <sup>172</sup>, aunque no hay pruebas de que esto pueda ocurrir *in vivo*. Por otro lado, en ovomucoide, Yamashita et al. encontraron oligosacáridos unidos N-glicosídicamente con estructura  $\text{Man}_{\alpha 6} \rightarrow \text{Man}_{\beta 4} \rightarrow \text{GlcNAc}_{\beta 4} \rightarrow \text{GlcNAc}$  lo que los llevó a postular un camino diferente que no debiera pasar por la

N-acetilglucosaminil transferasa que los grupos de Kornfeld y Robbins <sup>72, 173</sup> consideraban obligada. Pero el grupo japonés no tiene evidencias de tipo biosintético <sup>174</sup>.

### III.2.b) Tripanosomatidos:

La familia de los protozoarios parásitos, los tripanosomatidos, constituye hasta ahora la única excepción en cuanto a la estructura del oligosacárido que se transfiere a proteína a partir de su lípido-oligosacárido intermediario. El primer organismo estudiado fue *Chritidia fasciculata* en el cual el intermediario tenía la estructura  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$  <sup>148</sup>. El tamaño de la porción lipídica resultó ser igual al del interme-



diario bacteriano: 11 unidades isoprenoides, aunque en este caso el poliprenol tenía saturada su unidad  $\alpha$ -isoprenoide como en los dolicoles <sup>152</sup>.

En *Trypanosoma cruzi* el oligosacárido del intermediario tenía la composición  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  <sup>144</sup> y el dolicol un tamaño de 13 unidades isoprenoides <sup>144</sup>. La estructura del oligosacárido era igual a la del intermediario en la síntesis de  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$  en mamíferos. En ninguno de los dos protozoarios se sintetiza  $\text{Glc-P-Dol}$ . El mecanismo de procesamiento está ilustrado en la fig. 18 <sup>144</sup>. En los dos casos ocurre glucosilación transitoria. Los oligosacáridos finales son del tipo "polimánosa" o "híbrido", como en el caso de *Chritidia fasciculata*, en la que además se transfiere galactosa con la peculiaridad de encontrarse en la forma furanósica <sup>11</sup>.

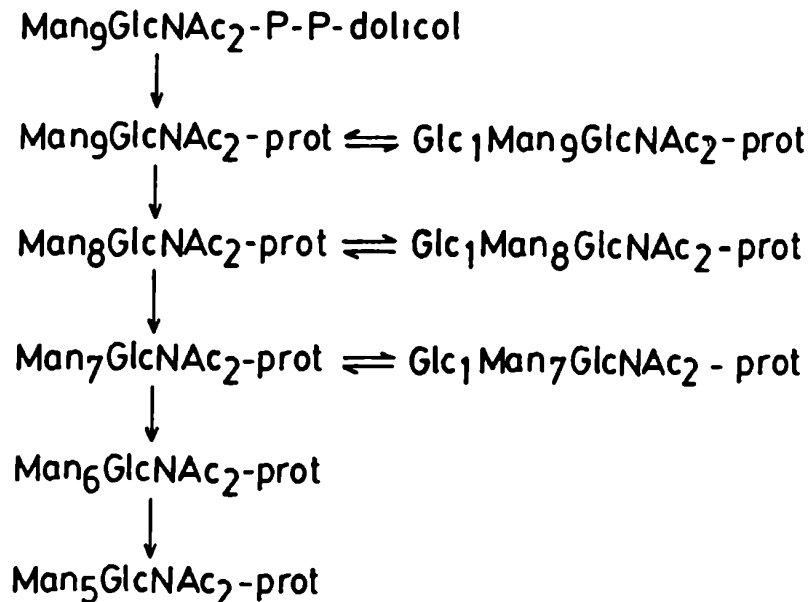


Fig. 18. Transferencia y procesamiento de oligosacáridos con unión N-glicosídica a proteína en *Trypanosoma cruzi*.

-49-

Ninguno de los otros tripanosomátidos estudiados presentó un lípido-oligosacárido glucosilado. Sin embargo, dos de ellos, *Leishmania adleri* y *Herpetomonas muscarum*, sintetizaban Glc-F-Dol, por lo que debía estar ausente la enzima que transfiere la glucosa de aquél al lípido-oligosacárido<sup>175</sup>.

### III.2.c) Saccharomyces cerevisiae:

Como vimos en la sección II, *S.cerevisiae*, así como otros hongos, sintetiza unido N-glicosídicamente a proteína un oligosacárido (o polisacárido) del tipo "manano".

En la figura 19 vemos el esquema de procesamiento de oligosacáridos unidos N-glicosidicamente en *S.cerevisiae*.

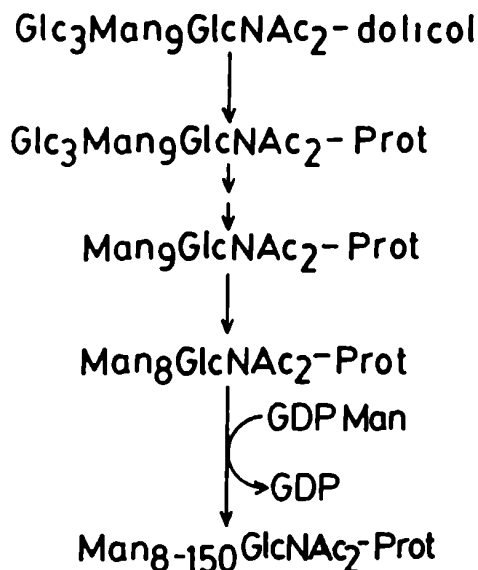


Fig. 19. Transferencia y procesamiento de oligosacáridos con unión N-glicosídica a proteína en *Saccharomyces cerevisiae*.

El precursor transferido a proteína es igual al de mamíferos<sup>174,177</sup>. Luego se pierden las glucosas y una manosa<sup>178</sup>. Se adiciona luego una manosa pero esta vez unida 1-6<sup>71</sup>. Finalmente por transferencia directa de GDPMan se sintetiza la cadena externa del manano<sup>177,180</sup>. Los grupos Man-P existentes en el manano se transfieren a partir de GDPMan<sup>181</sup>.

El lípido del intermediario que participa es un dolicol de unas 16 unidades isoprenoides<sup>182</sup>.

El único organismo para el cual hasta ahora se había estudiado y probado fehacientemente la participación de lípido-oligosacáridos intermediarios en la síntesis de glicoproteínas con estructuras de tipo "manano" era *S.cerevisiae*. En otros hongos, varios estudios realizados hasta el momento han descrito la síntesis de Man-P-Dol: en *Hansenula holstii*<sup>183</sup>, *Aspergillus niger*<sup>184</sup>, *Neurospora crassa*<sup>129</sup>, *Dictyostelium discoideum*<sup>185</sup>, *Mucor rouxii*<sup>186</sup>. En este último hongo se estudió la biosíntesis de oligo-(poli-)sacáridos del tipo "manano" y la intervención de lípido-oligosacáridos intermediarios, lo cual se describe en esta Tesis.

### III.3. FUNCIONES DE LA GLICOSILACION DE PROTEINAS:

Aunque se han hecho muchos estudios al respecto, se sabe todavía muy poco de las funciones de la glicosilación de las proteínas, en especial de las funciones biológicas. Sin embargo, se puede afirmar que la principal función de los azúcares en muchas proteínas es darles una "identidad", una señal de reconocimiento. Esta señal de reconocimiento permite que estas moléculas se ligen a receptores celulares cuando son circulantes o actúen como receptores cuando están integradas a la membrana celular. Estos "receptores" pueden reconocer distintas moléculas o mensajeros, o interactuar con moléculas de otras membranas o

sustratos, realizando funciones de adhesión célula-célula o célula-sustrato.

**III.3.a) SEÑAL PARA EL TRANSPORTE DE PROTEINAS A MEMBRANA O PARA SU SECRECION:** Como la mayoría o todas las proteínas de membrana son glicoproteínas, se pensó en un principio que la glicosilación podría otorgar una señal a la proteína para su transporte y ubicación celular. Algunos estudios indicaron que inhibiendo la glicosilación se impedía la secreción de inmunoglobulinas<sup>107, 108</sup> o el encapsulamiento de virus<sup>109</sup>. Sin embargo, otros trabajos mostraron que la inhibición o modificación de la glicosilación no afectaban la ubicación celular de las moléculas, por ejemplo en el caso de la ovalbumina, interferón o en mutantes que no sintetizaban la cadena externa de manano en *S.cerevisiae*<sup>71</sup>. En general hoy se admite que la glicosilación no tiene que ver en forma directa con el transporte celular<sup>137</sup>.

**III.3.b) FUNCION ESTRUCTURAL:** Muchas glicoproteínas tienen un importante papel estructural. Esto se ve claramente en las de tipo manano que mantienen la integridad de la pared celular<sup>99</sup>

**III.3.c) CONFORMACION PROTEICA:** En muchos casos los azúcares tienen una función determinante en conferir una dada conformación a la proteína necesaria para su actividad biológica. Este es el caso de las inmunoglobulinas<sup>190, 91</sup>. También es el caso de la glicoproteína G del virus VSV; si se inhibe su glicosilación la proteína se exporta a la membrana plasmática pero en forma agregada, y por lo tanto se impide el ensamblado del virus<sup>191</sup>. Lo mismo ocurre si se inhibe el procesamiento del oligosacárido transferido a la proteína<sup>192</sup>.

III.3.d) COBERTURA ESPACIAL DE LA PROTEÍNA: Otra función que podemos llamar física o mecánica de los azúcares es la cobertura de la proteína, que como analiza Montreuil puede llegar a cubrirla en casi toda su extensión<sup>81</sup>. Este hecho protege a muchas glicoproteínas de la degradación por proteasas, como en el caso de la fibronectina que se degrada rápidamente en células tratadas con tunicamicina<sup>193</sup> que, como explicamos antes, inhibe la síntesis de oligosacáridos con unión N-glicosídica. La cobertura espacial puede también ser responsable de la poca antigenicidad de las porciones proteicas de proteínas muy glicosiladas<sup>81</sup>.

III.3.e) ACTIVIDAD ENZIMÁTICA: Hay algunos trabajos que describen la pérdida de actividad de enzimas cuando se inhibe su glicosilación, como es el caso de la fosfatasa alcalina humana<sup>174</sup> o la fosfatasa ácida de *S.cerevisiae*<sup>195</sup>. Pero también hay muchos estudios que indican que la inhibición de la glicosilación no afecta la actividad enzimática<sup>14</sup>.

III.3.f) SEÑAL DE RECONOCIMIENTO: Como indicábamos antes, la función de los azúcares como señal de reconocimiento es la mejor establecida. Por ejemplo en las glicoproteínas que determinan especificidad de grupo sanguíneo ciertos residuos de azúcar dan una especificidad de grupo cuando están presentes siendo otra si no lo están (fig. 1)<sup>194</sup>.

Los azúcares actúan como señal de reconocimiento para la catabolización de ciertas glicoproteínas circulantes. Así, el caso de la ceruloplasmina, fetuina, etc., en las que al ser tratadas con neuraminidasa quedan expuestas galactosas terminales, actuando éstas como señal de reconocimiento para la captación de las moléculas por células parenquimales del hígado, siendo luego catabolizadas en los lisosomas<sup>197</sup>.

Las enzimas lisosomales poseen una señal para ser recapturadas una vez que son secretadas de las células<sup>178</sup> o para su transporte intracelular. Esta señal se identificó como Man-6-P en extremos no reductores de oligosacáridos N-glicosídicos<sup>179</sup>. Hace que las enzimas se dirijan desde el aparato de Golgi a los lisosomas<sup>37,200</sup>.

Una función muy importante cumplen los azúcares en las glicoproteínas en reconocimiento y adhesión celular, generalmente interaccionando con moléculas del tipo lectina que muchas veces son también glicoproteínas<sup>201</sup>. Algunos ejemplos pueden ser: la agregación de *Dictyostelium discoideum* en que intervienen los llamados 'sitios A'; la coquina sintetizada durante el desarrollo de la retina de embrión de pollo<sup>202</sup>; los factores  $\alpha$  y  $\alpha$  de atracción y conjugación sexual de *S.cerevisiae* y los de otras levaduras. En el caso de *S. kluyveri* se identificaron los factores de adhesión como dos glicoproteínas y la actividad de una de ellas era inhibida tratándola con  $\alpha$ -manosidasa, y resultó clara la intervención funcional de los azúcares<sup>203</sup>. Otros ejemplos son: el receptor de espermatozoides ZP3 en la zona pelúcida de óvulos de ratón<sup>204</sup>; el factor de agregado en esponjas<sup>205</sup>; las 'galaptinas', lectinas animales de bajo PM, específicas para  $\beta$ -galactosa, que intervendrían en la adhesión celular formando puentes entre glicoproteínas de membrana<sup>206</sup>.

La fibronectina es una glicoproteína que cumple un rol muy importante en todos los tipos de células (menos las no adherentes como linfocitos o algunos macrófagos). Se encuentra entre y debajo de las células, siendo responsable de adhesión célula a célula y célula a sustrato (membrana basal y tejido conectivo)<sup>207,208</sup>. Se une también al citoesqueleto (a actina), participando de la determinación de la morfología celular<sup>207</sup>. En células transformadas en cultivo, al mismo tiempo que desapa-

rece la inhibición por contacto disminuye la cantidad de fibronectina. Un indicio de que los azúcares podrían estar involucrados en la acción de la fibronectina lo da el hecho de que la aglutinación de eritrocitos de oveja provocada por ella es inhibida en presencia de aminoazúcares<sup>210</sup>. En células epiteliales, a pesar de que está presente la fibronectina, el papel principal en adhesión lo cumple otra glicoproteína, la laminina<sup>211</sup>.

Como señalamos en la sección I.9, la molécula de adhesión celular neuronal (NCAM) es una glicoproteína que participa en diversas funciones de adhesión reguladas por la modulación de la microheterogeneidad de su porción oligosacarídica<sup>25</sup>.

**III.3.g) TRANSFORMACION CELULAR:** Hay muchos estudios relacionando una glicosilación alterada de proteínas con transformación celular. Por ejemplo, células transformadas en cultivo que pueden producir metástasis al ser inoculadas en ratones poseen mayor proporción de ácido siálico que las que no son capaces<sup>212</sup>. Células transformadas tienen oligosacáridos de tipo N-glicosídico 'complejo' multiantena (4 o 5 antenas) mucho más abundantes que en células normales<sup>213</sup>. Ocurre lo mismo con inmunoglobulinas M patológicas<sup>214</sup>.

## IV. — METILACION IN VIVO

El fenómeno de metilación de macromoléculas es un proceso que viene ganando la atención de un número creciente de grupos de trabajo. Esto es debido a las funciones biológicas de la metilación que se están encontrando principalmente en DNA, RNA y proteínas. Algunas relaciones también se están hallando en la metilación de polisacáridos.

La metilación en glicoproteínas, encontrada en el trabajo descrito en esta Tesis, abre un nuevo campo en el estudio de las relaciones funcionales de este proceso.

### IV.1. METILACION DE DNA:

La metilación en DNA se viene estudiando extensivamente en los últimos años<sup>214</sup>. En procariotes se puede metilar el nitrógeno 6 de adenina o el carbono 5 de citosina. En eucariotes se encuentra muy poca metilación de adenina, pero la de citosina llega a ser abundante en mamíferos. En eucariotes inferiores hay muy poca metilación de DNA, pero sí la hay en plantas, llegando en las superiores al 50% de las citosinas metiladas. Casi siempre la metilación de citosina ocurre en secuencias 5'-CpG-3'.

Poco se sabe del modo en que la metilación del DNA regula los procesos biológicos descritos más adelante. Se encontró que algunas enzimas de restricción no actúan en sus secuencias específicas al estar metilada alguna base. Por el contrario, hay otras enzimas que sólo reconocen una secuencia con una base metilada<sup>215</sup>. Una forma de acción es interfiriendo en la interacción DNA-proteína; hay ejemplos de influencias positivas y negativas. La unión del represor lac es mayor, por ejemplo, cuando el operador está metilado<sup>216</sup>.



Hay una relación muy repetida en que las regiones de DNA más activamente transcritas están submetiladas, mientras que las inactivas están muy metiladas. En animales el 70% de las secuencias CpG están metiladas, mientras que en las regiones más activas en transcripción (las más sensibles a DNasa I) sólo el 30-40 % de esas secuencias están metiladas<sup>217</sup>. Existen más secuencias CpG cerca de zonas promotor o leader o 5' de genes<sup>218</sup>.

Varias evidencias sugieren que la metilación del DNA es una señal de regulación de la expresión en genes de eucariotes. El grado de metilación de secuencias CCGG tiene relación inversa con la expresión del gen en el que participa<sup>217</sup>, aún más acentuada que en el caso de CpG.

Se pueden metilar secuencias *in vitro* utilizando metiltransferasas secuencia-específicas de procariotes. Con un gen de adenovirus se vio que si se metilaban secuencias relacionadas con la regulación de la expresión genética y luego este DNA se microinyectaba en ovocitos de *Xenopus laevis* no se transcribía<sup>220</sup>; pero si las secuencias no eran de regulación sí se transcribía<sup>221</sup>.

Se metilaron con metiltransferasa EcoR1 (sitio-específica para metilación de adenina en la secuencia GAATTC), genes clonados de antígeno T de virus SV40. (El antígeno T, "large tumor antigen", se expresa en membranas de las células infectadas por el virus). Por otro lado con la misma enzima se metiló el gen clonado de timidina quinasa (TK) del virus *Herpes simplex*; ambos genes se microinyectaron luego en ovocitos de *X.laevis*. El gen de SV40 se expresó aunque estaba metilado en 24 sitios diferentes. El gen de TK no se expresó aunque estaba metilado sólo en 1 sitio. Este sitio se encontraba en una región regulatoria<sup>222</sup>.

Estos experimentos muestran que la metilación afecta en forma diferente distintos genes y que actúa inhibiendo la

expresión sólo en regiones regulatorias.

Hay estudios que correlacionan hipometilación con transformación<sup>223,224</sup>. La actividad de transformación del DNA viral clonado de sarcoma de Moloney es inhibida al metilarlo *in vitro*<sup>225</sup>.

La 5-Azacitidina es un análogo de la citidina que inhibe la metilación de DNA inactivando las metiltransferasas (en más del 95%). Se han hecho muchos estudios con esta droga. Por ejemplo induce la diferenciación a células musculares, condrocitos o adipocitos de fibroblastos de ratón en cultivo<sup>226</sup>. Genes normalmente inactivos de hipoxantina-guanosina fosforribosil transferasa (HGPRT) de cromosomas X humanos son activados por la 5-Azacitidina<sup>227</sup>. Células CHO timidina-quinasa negativos pasaron a ser TK+ luego de tratadas con la droga<sup>228</sup>.

En el alga *Chlamydomonas* se hereda el DNA cloroplástico materno perdiéndose el paterno. Se encontró que el DNA cloroplástico femenino tiene las secuencias CCGG metiladas mientras que el masculino no<sup>229</sup>. Hay evidencias también de que la inactivación de uno de los cromosomas X en células somáticas de hembras de mamíferos durante el desarrollo embrionario ocurre por metilación<sup>230,231</sup>.

Una línea de células T linfoblastoides puede ser infectada persistentemente con el virus de *Herpes simplex* tipo 1 (HSV1). Se puede mantener el estado no-productivo de estas células con concanavalina A y revertirlo con fitohemoaglutinina. El DNA viral en células no-productivas está extensivamente metilado y no lo está en las productivas<sup>232</sup>. Este ejemplo relaciona la función de las glicoproteínas con la metilación: Receptores glicoproteicos para la fitohemoaglutinina actúan como señales para que se inhiba la metilación de DNA y las células comiencen a producir virus.

Todavía quedan muchas preguntas por responder. Por ejemplo qué ocurre en eucariotes inferiores como en *Drosophila* muy bien estudiada genéticamente y que casi no tiene bases metiladas.

#### IV.2. METILACION DE RNA:

Aunque se viene estudiando hace bastante tiempo la metilación en RNA, poco se sabe de las funciones de este proceso, mucho menos que sobre la que ocurre en DNA que describimos en la sección anterior.

La metilación más abundante ocurre en tRNA. En procariotes están metiladas unas 2 a 4 bases por molécula; en eucariotes son unas 10 bases. Ciertas bases están casi invariablemente metiladas en eucariotes: la A invariante en el brazo GTTC (1mA); 1mG en posición 9, N<sup>2</sup>-mG en la 10 y N<sup>2</sup>di-mG en la 29. No se conocen funciones para esta metilación en tRNA, aunque podría intervenir en determinar la conformación espacial de las moléculas<sup>233</sup>.

En rRNA de procariotes ocurre mucho menos metilación que en tRNA, menos de 1% de las bases están metiladas<sup>234</sup>. En rRNA 16 S de *E.coli* existen 6 regiones con algunas bases metiladas y éstas son: m<sup>7</sup>G, m<sup>2</sup>G, m<sup>2</sup>C, m<sup>4</sup>C, m<sup>5</sup>C, mU y m<sup>6</sup>2A. En el rRNA 23 S ocurre también metilación en las ribosas (en carbono 2)<sup>235</sup>. En eucariotes ocurre bastante metilación en las ribosas de rRNA. Es interesante que, comparando rRNA 18 S de *Xenopus laevis* y *S.cerevisiae*, las regiones homólogas están más metiladas que zonas intermedias que no son homólogas<sup>234</sup>. Se sabe poco también de la función de la metilación en rRNA, aunque en algunos casos se ha relacionado la metilación de ribosas con resistencia a antibióticos en bacterias: *Streptomyces azureus* produce el antibiótico thiostrepton que inhibe la

-59-

síntesis de proteínas en bacterias uniéndose a las unidades 50 S de ribosomas en la relación 1:1. Estudiando cómo la misma *S. azureus* era resistente a este antibiótico, Cundliffe et al. encontraron que era debido a la metilación en carbono 2 de una ribosa del rRNA 23 S<sup>237,238</sup>. Mutantes de *E. coli* en que el rRNA 16 S está submetilado y no contiene N<sup>6</sup>,N<sup>6</sup>-dimetiladenina cerca del extremo 3' terminal, son resistentes a Kasugamicina<sup>239</sup>. Este es un ejemplo en que la resistencia se da por falta de metilación. En algunas cepas de *Staphylococcus* y *Streptococcus* con genotipo MLS (resistencia a antibióticos del tipo macrolido, lincosamida y streptogramina B) el rRNA 23 S está sobre-metilado, habiendo dos residuos extra de A en la forma N<sup>6</sup>,N<sup>6</sup>-dimetiladenina<sup>240</sup>.

En mRNA ocurre poca metilación pero esta parece cumplir un papel fundamental. En eucariotes, todos los mRNA tienen su extremo 5' terminal modificado y con bases metiladas. Este es el llamado CAP que puede tener dos estructuras<sup>241</sup>:

CAP 1: m<sup>7</sup>GpppN'm-N'' por ej. m<sup>7</sup>GpppG<sup>m</sup>pC en reovirus<sup>242</sup>

CAP 2: m<sup>7</sup>GpppN'm-N''m-N'''

También existen (aunque pocas) adeninas internas metiladas: m<sup>4</sup>A. Se encuentra CAP también en RNA heterogéneo nuclear (hRNA)<sup>243</sup>.

Aunque no está clara aún la función del CAP, éste interviene en el control de la iniciación de la síntesis de proteínas. Virus VSV con mRNA con CAP son traducidos por extracto de germen de trigo más eficientemente que cuando tienen mRNA no metilado<sup>244</sup>. El nucleótido 7-metilguanosina, 5'-monofosfato, análogo del CAP, inhibe la síntesis de globina en sistemas libres de células<sup>245</sup>. Reovirus con mRNA conteniendo m<sup>7</sup>GpppG<sup>m</sup>... se une eficientemente a subunidades ribosomales 40 S de germen de trigo, mientras que no se unen o lo hacen débilmente los que tienen ppG... o GpppG... en su extremo terminal<sup>246</sup>.

#### IV.3. METILACION DE PROTEINAS:

Los aminoácidos metilados más comunes encontrados en proteínas son  $\epsilon$ -N-monometil lisina,  $\epsilon$ -N-dimetil lisina,  $\epsilon$ -N-trimetil lisina,  $N^{\epsilon}$ -monometil arginina,  $N^{\epsilon}, N^{\epsilon}$ -dimetil arginina, los metil ésteres de ácido glutámico y aspártico. También se ha encontrado  $\delta$ -N-metil ornitina y 3-N-metil ornitina. Aunque tienen residuos metilados una variedad de proteínas de diversos organismos, es interesante que están notoriamente metiladas proteínas de músculo: actina, miosina, proteína miofibrilar<sup>247</sup>. En todos los casos la metilación ocurre post-traduccionalmente.

Las metiltransferasas involucradas tienen una gran especificidad, pudiendo metilar sólo uno entre muchos aminoácidos metilables de una proteína, incluso *in vitro*<sup>248</sup>. Se ha dividido estas metiltransferasas en tres tipos:

- I) arginina metiltransferasa.
- II) carboxilo metiltransferasa.
- III) lisina metiltransferasa.

Sobre las funciones de la metilación en proteínas el caso más estudiado ha sido el de la quimiotaxis en bacterias flageladas. En *E. coli* se encuentra una proteína en membrana que se metila en el -COOH del ácido glutámico y si se inhibe este proceso no ocurre quimiotaxis. Esta proteína fue llamada MCP (methyl-accepting chemotaxis protein)<sup>249</sup>. También se encontró en *Salmonella typhimurium*<sup>250</sup>. Luego se encontró también en otras bacterias flageladas. *Caulobacter crescentus* tiene un flagelo sólo durante un determinado lapso de su ciclo de vida, y cuando no lo tiene no ocurre metilación de MCP<sup>251</sup>. El mecanismo que se conoce hoy para la quimiotaxis dependiente de metilación es el ilustrado en la figura 20. Las proteínas producto de los genes Tap, Ter, Tar y Trg (que son las MCP's)

-61-

actúan como receptores para distintos atractantes, se activa entonces el mecanismo de metilación y las MCP's metiladas traducen el mensaje que por medio de los productos de los genes A, W, Y, Z, S llega a los receptores C y V en el "motor" del flagelo, induciendo el movimiento direccionado. Una disminución en la concentración del atractivo o un aumento de repelente activan la de-metilasa que vuelve la célula al estado inicial<sup>252</sup>.

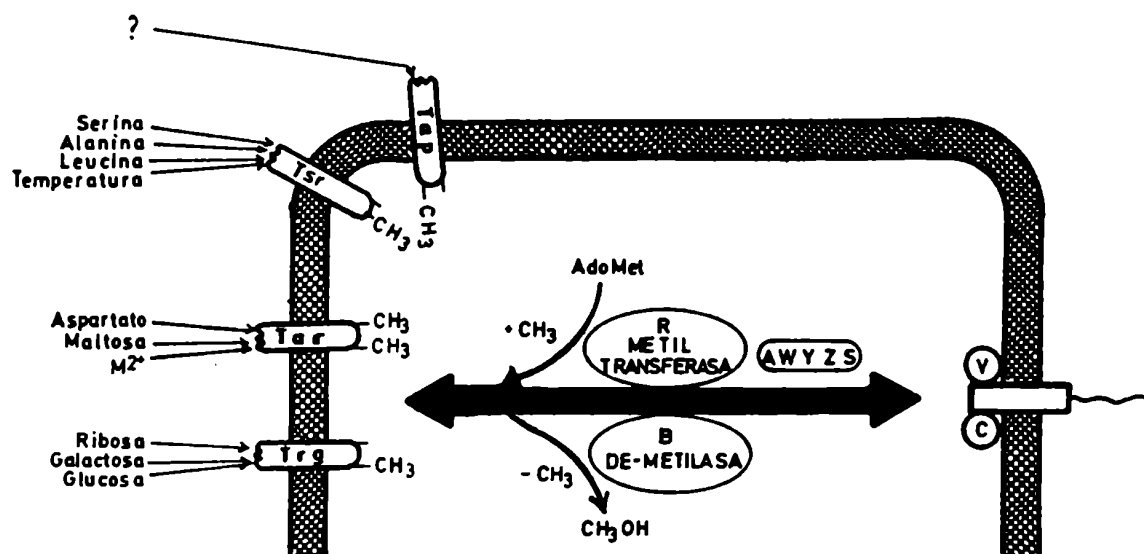


Fig. 20. Esquema de la quimiotaxis dependiente de metilación en bacterias coliformes. Los atractantes se unen directamente a una proteína transductora (*Tap*, *Tsr*, *Tar*, *Trg*), (las llamadas proteínas de quimiotaxisceptoras de metilo (MCP)), o se unen a un receptor soluble que se liga a una de estas proteínas. El camino de la excitación puede involucrar los productos de los genes A, W, Y, Z y S, como reguladores de respuesta, y a los productos de C y V como controles del motor flagelar.

En *Dictyostelium discoideum* se encontró que la quimiotaxis que induce el fenómeno de agregación es mediado por metilación de una proteína, y este último mecanismo responde a la acción de cAMP como mensajero<sup>253</sup>.

En eucariotes superiores también se ha encontrado que la

carboximetilación interviene en fenómenos de quimiotaxis; por ejemplo en monocitos humanos, aumentando con antibióticos la concentración intracelular de SAhcyst, se inhibe la carboximetilación de proteínas y también la quimiotaxis, y no así la fagocitación de agentes extraños<sup>254</sup>. Ciertos péptidos que inducen la quimiotaxis en leucocitos estimulan la carboximetilación de proteínas<sup>255</sup>.

Otra función posible de la metilación de proteínas es en el mecanismo de secreción. En médula adrenal hay un proceso de carboximetilación relacionado con la fusión de vesículas secretoras con la membrana plasmática. La explicación es que para que este contacto y fusión ocurran debe disminuir la carga negativa de la membrana, lo cual ocurre tras la carboximetilación <sup>256</sup>. Un fenómeno de potencial de membrana ocurriría también en proteínas de músculo o similares que, como dijimos antes, tienen aminoácidos metilados (actina, miosina, "troponin-C-like factor"). La metilación neutralizaría las cargas negativas provocando la despolarización de membrana, con el consiguiente influjo de calcio y posterior contracción<sup>257</sup>.

Hay estudios que relacionan la metilación de histonas con el aumento de la proliferación celular<sup>247</sup>.

#### IV.4. METILACION DE POLISACARIDOS:

Los O-metil azúcares, aunque generalmente aparecen en muy bajas proporciones, no son raros en la naturaleza, en especial en procariotes, y dentro de éstos es muy común encontrar residuos metilados en polisacáridos de cianobacterias (Ver Tabla 1). También se encuentran, aunque menos frecuentemente, en hongos<sup>258</sup>, algas<sup>260, 261</sup> y plantas<sup>262</sup>. Muchos de estos organismos tienen un hábitat de suelo, y analizando suelos se han encontrado en una sola muestra 27 monosacáridos metilados diferentes<sup>263</sup>.

AZUCAR	SUELO	CIANO-BACT.	OTRAS BACT.	ALGAS	PLANTAS	HONGOS	OTROS
PENTOSAS Y DESOXIAZUCARES							
3-O-Me-							
6-desoxitalosa		264					
2-O-MeXil	263	264			262		
3-O-MeXil	263	264		260 261			
4-O-MeXil		264					
3-O-MeRib		264	293				
2-O-Me-D-Ramn		264					
2-O-MeRamn	263	264					
3-O-MeRamn	263	264		286			
4-O-MeRamn	263						
2-O-MeFuc		264			262		
3-O-MeFuc	263						
2-O-MeAra	289						
2,3-di-O-MeRamn	263			260			
2,4-di-O-MeRamn	263						
3,4-di-O-MeRamn	263						
2,3-di-O-MeFuc	263	264					
2,3-di-O-MeAra	263						
2,3-di-O-MeXil	263						
2,3,4-tri-O-MeAra		264					
HEXOSAS							
2-O-MeMan	263	264					
3-O-MeMan	263	264	282			259 281	279
4-O-MeMan		264	284				
6-O-MeMan	263	264		260			
6-O-Me-L-Man				260			
2-O-MeGal	263	264					
3-O-MeGal	263			286	262	258 280	279
4-O-MeGal	288		294		262		
6-O-MeGal	263		285	287 291			
2-O-Me-L-Gal				287			
2-O-Me-3,6-anhidro-Gal				287			
2-O-MeGlc	263						
3-O-MeGlc	263		285				
4-O-MeGlc			294				
6-O-MeGlc	263		282 283				
6-O-MeGlcNH <sub>2</sub>		264					
2-O-MeGalUA			292				
4-O-MeGlcUA					269		
2,4-di-O-MeMan	263						
2,6-di-O-MeMan			271 272				
2,3-di-O-MeGal		264					
2,6-di-O-MeGal	263						
2,6-di-O-MeGlc	263						
3,6-di-O-MeGlc	263						
2,3-di-O-MeGlc	263						
2,4-di-O-MeGlc	263						
6-O-Meheptosa		264					

Tabla 1. Distribucion de metil-azúcares en la naturaleza. Los números en la tabla indican las referencias donde se describen los azúcares respectivos.



Se pueden encontrar azúcares mono, di y hasta trimetilados<sup>264</sup>. Aunque en general en un polisacárido se encuentra un solo tipo de azúcar metilado, se han encontrado coexistentes hasta cuatro, por ej. en el alga *Emiliana huxleyi*<sup>260</sup>.

3-O-Metilmanosa es uno de los O-metil azúcares más frecuentemente encontrados junto con 3-O-Me-Ram, 6- y 3-O-Me-Gal, 3-O-Me-Xil, 2-O-Me-Gal. En muchos casos se encuentra la 3-O-Me-Man sólo en extremos no reductores<sup>265, 266</sup>.

Sobre la biosíntesis de estos polisacáridos metilados, en ningún caso de los estudiados hasta ahora existe metilación al nivel de nucleótido-azúcares. Sí ocurre metilación a este nivel en el caso de azúcares C-metilados (también llamados ramificados), y en los cuales no existe en productos finales el azúcar sin metilar, como el caso de TDP-mycarosa o CDP-vinelosa<sup>267</sup>.

Generalmente la metilación ocurre sobre el polisacárido ya polimerizado<sup>268, 269</sup>, aunque se ha encontrado también el caso de adición secuencial de residuos de manosa y su subsecuente metilación<sup>270</sup>. El único dador de metilos encontrado hasta ahora es la S-adenosil metionina.

Sobre la función de la metilación de azúcares se sabe poco. En algunos casos se le ha adjudicado un rol como protección de la degradación por exo-glicosidasas, como en el caso de la hemicelulosa de varias especies de árboles<sup>262</sup>. En dos antibióticos, la avilamycina y la curamycina existe 2,6 di-O-Me-Man, que podría tener un papel activo<sup>271, 272</sup>.

El estudio más interesante es el que se ha venido llevando a cabo sobre los polisacáridos metilados de micobacterias. Las micobacterias (*Mycobacterium smegmatis*, *M. phlei*, etc.) sintetizan dos polisacáridos metilados, uno compuesto de 3-O-Me-Man y el otro de 6-O-Me-Glc<sup>273, 274</sup>. Estos polímeros polimetilados con la estructura ilustrada en la figura 21 se encuentran en el citoplasma de las células y forman complejos muy

-65-

estables con acil-derivados de cadena larga de coenzima A<sup>276,276</sup>. A través de este mecanismo estos polisacáridos parecen regular el metabolismo de ácidos grasos: En la síntesis de ácidos grasos, si el largo de la cadena de éstos no excede los 16 átomos, el complejo terminal acil-CoA-enzima (ácido graso sintetasa) se descompone rápidamente liberando el ácido graso. Sin embargo, para cadenas más largas la velocidad de descomposición del complejo disminuye drásticamente y por lo tanto el proceso se detiene porque el producto ocupa los sitios activos de la enzima. En presencia de los metil-polisacáridos el proceso de descomposición se acelera y por lo tanto ellos determinan la síntesis de ácidos grasos de cadena larga (24-26 C) que forman parte de la estructura de polímeros de pared: ácido micólico, "cord factor"<sup>277</sup>. Al entrar en contacto complejos de acil-CoA de cadena larga con los metil-polisacáridos, éstos adoptan una estructura helicoidal con los metilos hacia el interior que entonces interactúa con el ácido graso envolviéndolo<sup>278</sup>.

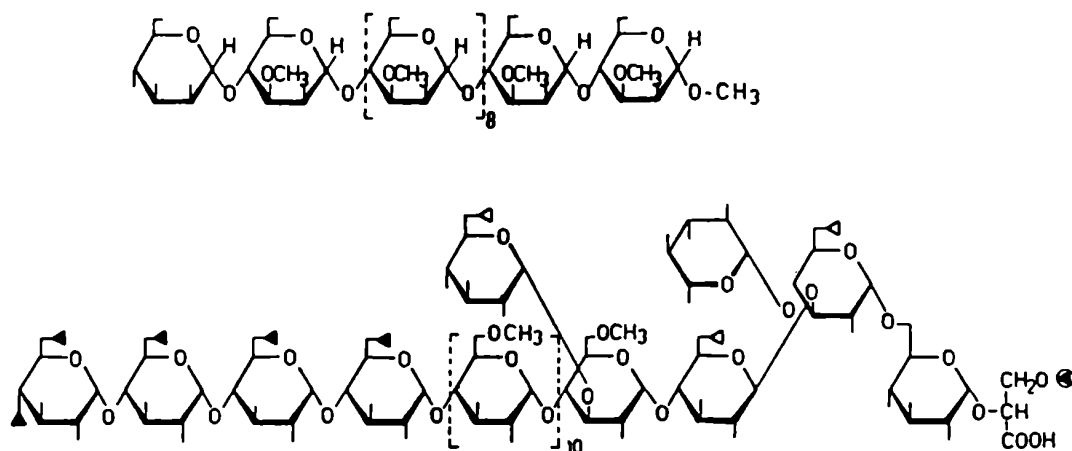


Fig. 21. Estructuras de polimetil polisacáridos de micobacterias. A. Polisacárido de metil manosa (MMF-III). B. Lipopolisacárido de metil glucosa (MGLP) con grupos acilo sustituyentes, neutros (▲) y ácidos (Δ).

#### IV.5. METILACION DE GLICOPROTEINAS:

Existe sólo un caso descripto de O-metil azúcares en glicoproteínas. Ocurre en las hemocianinas de dos caracoles, los gastrópodos pulmonados *Helix pomatia* y *Lymnaea stagnalis*. Estas glicoproteínas participan en la respiración de muchos invertebrados y contienen cobre. En un hidrolisado de hemocianinas se encontró 3-O-Me-Gal en *H. pomatia* y *L. stagnalis*, mientras que este último tenía también 3-O-Me-Man. No se estudió si los azúcares metilados se encuentran en cadenas N- u O-glicosídicas ni si ocupan posiciones terminales o no<sup>279</sup>.

Como se verá más adelante, en esta Tesis se determinó en *Mucor rouxii* la existencia de 3-O-Me-Man en extremos no reductores de oligosacáridos del tipo "polimánosa" y "manano" unidos N-glicosídicamente a proteína.

## V. - MUCOR ROUXII - DIMORFISMO

### V.1. TAXONOMIA Y BIOLOGIA DE M.ROUXII:

Mucor es un género de hongos de la clase Zygomycetes, orden Mucorales, familia Mucoraceae<sup>295</sup>. Textos más antiguos clasificaban a los Mucorales en la clase Ficomycetes porque se pensaba que estos hongos inferiores podían provenir de algas por pérdida de clorofila<sup>296</sup>.

Su hábitat es el suelo, o materia orgánica en descomposición, en general de tipo vegetal, pero también en estiércol. Son saprofíticos y algunos coprófilos. Algunas especies pueden ser parásitas de plantas y otros pueden ser patógenos animales y humanos en individuos inmunodeficientes. Las especies más comunes son *M.hiemaleis*, *M.raceosus*, *M. spinosus* y *M.mucedo*. *M.rouxii* es usado industrialmente para degradar almidón a glucosa para luego fermentar ésta con levadura y producir alcohol.

La reproducción asexual se da a través de esporangiosporas no móviles, a diferencia de la mayoría de los hongos inferiores que poseen esporas flageladas. La producción de esporas se induce por un medio sólido pobre del cual salen hifas aéreas con esporangios en las puntas, cuya pared se disuelve cuando están maduras, liberándose las esporas. Estas esporas, sembradas en medio líquido, germinan creciendo células levaduriformes o micelares, dependiendo de las condiciones de cultivo. Este es el dimorfismo de *Mucor rouxii* (fig. 22).

La reproducción sexual ocurre por conjugación con formación de zigosporas (fig. 23). Estas zigosporas son heterotálicas, y se forman solo cuando se juntan cepas compatibles. En este proceso ocurren tres reacciones: la telemórfica, la zigotró-

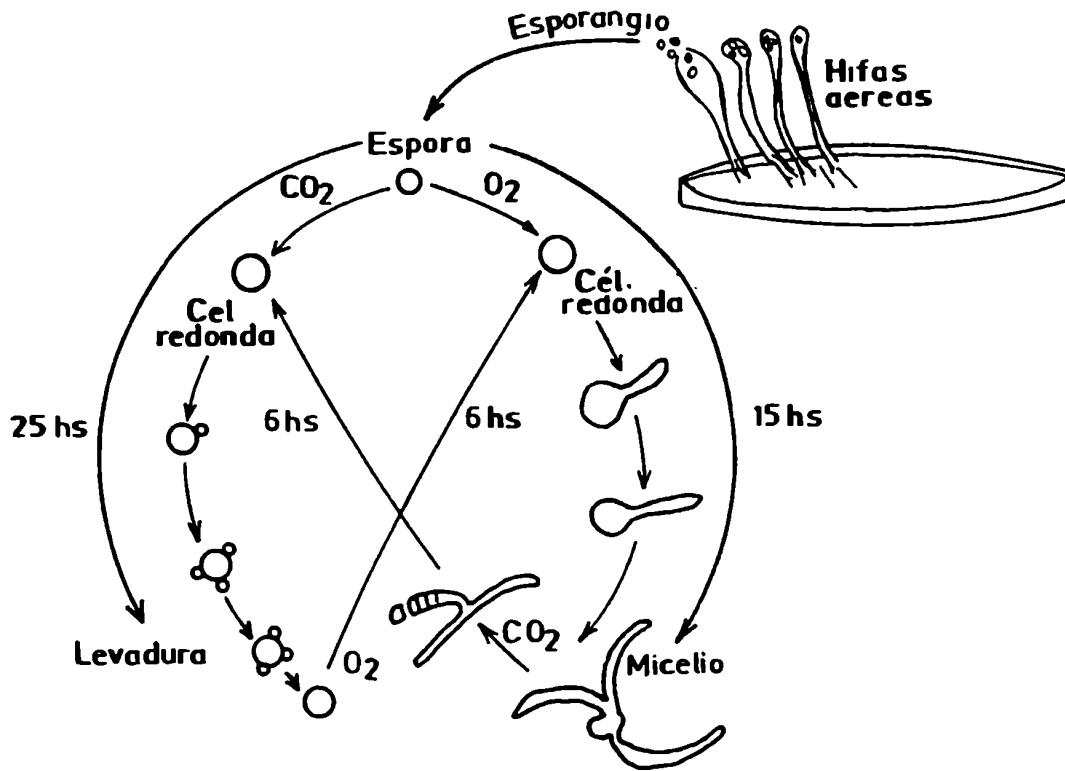


Fig. 22. Ciclo de REPRODUCCION ASEXUAL y DIMORFISMO en *Mucor rouxii*.

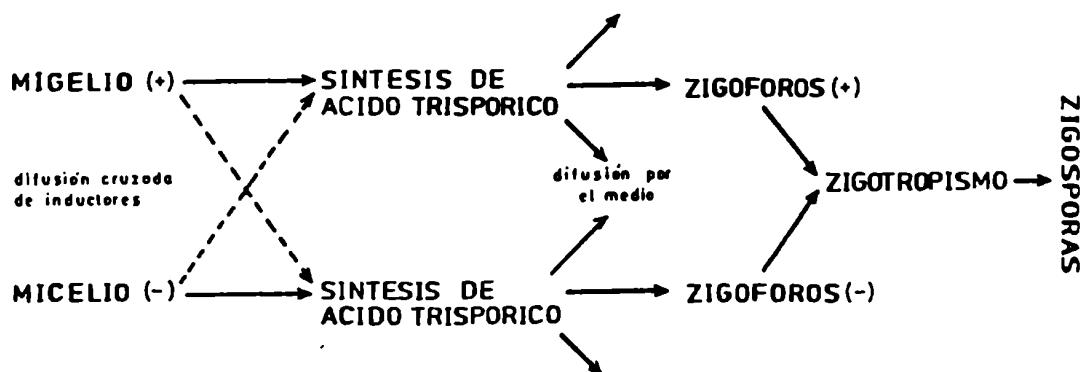


Fig. 23. Inducción de la conjugación sexual y formación de zigosporas en *Mucor rouxii*.

pica y la tigmotrópica<sup>277</sup>. La telemórfica implica la inducción de zigóforos aéreos. Esto se da mediante la inducción de la producción de hormonas terpenoides: los ácidos trisporicos (fig. 24). Al ponerse en contacto micelio de tipo (-) y de tipo (+) se producen prohormonas que en el "sexo" opuesto se convierten en ácidos trisporicos. Estos a su vez inducen la síntesis de prohormonas, completando el ciclo de retroalimentación. Por otro lado, inducen la formación de zigóforos y reprimen la de esporangioforos (fig. 23)<sup>278</sup>. La reacción zigotrópica implica la inducción del acercamiento de zigóforos + y - por compuestos volátiles. La tigmotrópica abarca los procesos que ocurren luego del contacto de los zigóforos opuestos. Se forma un progametangio y ocurre la fusión para dar una zigospora.

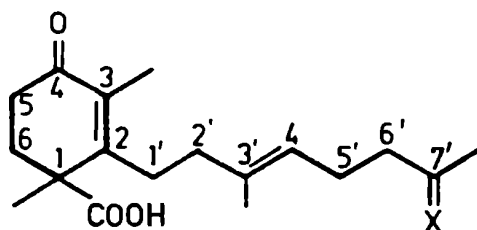


Fig. 24. Acido trispórico B, X=O. Acido trispórico C, X=H,OH

## V.2. DATOS HISTORICOS:

Las propiedades dimórficas de *Mucor* fueron observadas hace ya casi siglo y medio<sup>299</sup>. El haberse encontrado estas propiedades en una época tan temprana en el desarrollo de la microbiología provocó interpretaciones erróneas y fue la base de una interesante controversia entre Luis Pasteur y otros científicos de la época. Bail, en 1857, observando cultivos de *Mucor racemosus* vio que en el fondo de estos crecían células esféricas que se multiplicaban por brotación<sup>300</sup>. Concluyó que estas células eran de *Saccharomyces cerevisiae*, que en un determinado estado de desarrollo podían convertirse en *Mucor*. Esto apoyaba la teoría existente en ese entonces de la transmutación de las especies. Esta teoría fue desechada por Pasteur en 1861, quien interpretó el fenómeno como una adaptación de la morfología de *Mucor* al medio. Así, en la superficie de los cultivos, en presencia de aire crecía en la forma micelar, mientras que en el fondo con aereación insuficiente crecía en forma de levadura<sup>301</sup>. A las mismas conclusiones llegaron otros investigadores<sup>302,303</sup>.

Brefeld, en 1873<sup>304</sup> cultivando *Mucor racemosus* en

ausencia de oxígeno y bajo una corriente de hidrógeno observó células micelares concluyendo que la formación de células levaduriformes se debía a la acumulación de  $\text{CO}_2$  y no a la ausencia de oxígeno.

En 1930, Luers et al.<sup>305</sup> estudiaron comparativamente algunos procesos metabólicos de células micelares y levaduriformes de *Mucor*, encontrando diferencias en respiración, fermentación y actividades enzimáticas. Pero recién en la década de 1960 el grupo de Bartnicki-Garcia emprende un estudio sistemático de la inducción del dimorfismo y de los cambios resultantes en las células<sup>306</sup>.

### V.3. DIMORFISMO:

*Mucor rouxii* constituye un modelo simple y controlable de diferenciación celular. Su cultivo en laboratorio es rápido, sencillo y reproducible, y se puede controlar su dimorfismo mediante un solo factor, la  $p\text{CO}_2$ .

Cultivado en condiciones de anaerobiosis y en presencia de una  $p\text{CO}_2$  de por lo menos 0,3 atm., el hongo crece en forma de levadura, es decir células redondas que se multiplican por brotación. En anaerobiosis pero en ausencia de  $\text{CO}_2$  (por ej. en atmósfera de  $\text{N}_2$ ), el hongo crece en forma de micelio, es decir, células que se multiplican formando filamentos. El mismo tipo de crecimiento, micelar, se da en presencia de  $\text{O}_2$ , que anula el efecto del  $\text{CO}_2$  <sup>306</sup>.

Otro factor importante es la presencia y concentración de hexosas. Incluso bajo atmósfera de  $\text{CO}_2$ , si la concentración de glucosa en el medio es menor que 0,01 % el hongo crece en forma micelar<sup>307,308</sup>. A concentraciones de más de 2 % se obtienen sólo células de la forma levadura, bajo  $\text{CO}_2$ .

Cultivando células bajo  $\text{CO}_2$  con una sola fuente de



nitrógeno se obtiene un cierto porcentaje de formas micelares, mientras que en medio complejo sólo crecen células en forma de levadura<sup>309</sup>.

Agentes quelantes como por ejemplo EDTA, afectan la morfogénesis de *M.rouxii*; a altas concentraciones de estos agentes el hongo crece sólo en la forma micelar.

La transformación de la forma levadura a micelio va acompañada de síntesis de citocromo oxidasa, indicando una adaptación respiratoria<sup>310</sup>. A concentraciones de KCN mayores de 6 mM, el hongo crece sólo en la forma levadura, confirmando lo anterior<sup>308</sup>.

Bartnicki-García estudió la asimilación de CO<sub>2</sub> comprobando que unos dos tercios se incorporaban a proteínas, siendo un 75 % en ácido aspártico<sup>309</sup>. A partir de este hecho desarrolla una interesante hipótesis<sup>305</sup>. Propone, como se ve en la figura 25, que en presencia de CO<sub>2</sub> ocurre carboxilación de piruvato y su incorporación final en aspártico por el camino del ácido málico. El aspártico es un aminoácido abundante en manoproteínas. Él sugiere que éstas podrían sintetizarse para alterar la pared celular, anular su crecimiento polarizado, transformando la morfología micelar en levaduriforme. Estudios realizados por diferentes grupos en años posteriores están en general de acuerdo con esta hipótesis. Como veremos luego, la presencia de polímeros de manosa, algunos de ellos identificados más tarde como manoproteínas están muy aumentados en la forma levadura; esto se comprueba también en esta Tesis.

El grupo de Susana Passeron estudió la piruvato quinasa de *M.rouxii* y encontró tres isoenzimas diferentes. La presente en la forma levadura era activable por fructosa di-fosfato, mientras que la preponderante en el micelio no lo era<sup>311,312</sup>.

-73-

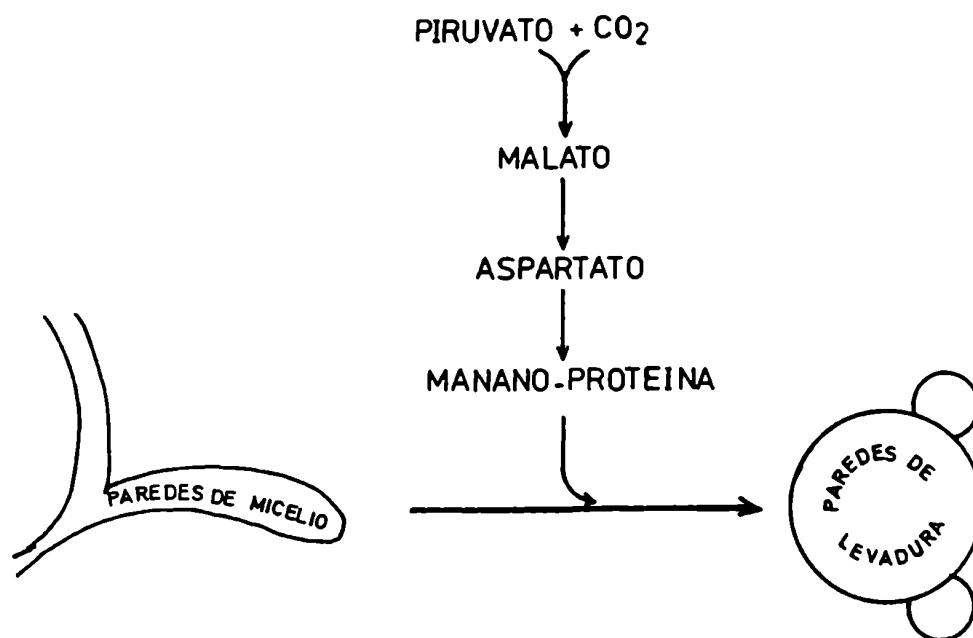


Fig. 25. Hipótesis de trabajo elaborada por S. Bartnicki-García sobre el mecanismo de inducción del crecimiento levaduriforme en *Mucor rouxii* <sup>305</sup>.

Otros estudios que relacionan el metabolismo de *Mucor rouxii* con su dimorfismo incluyen la adenilato ciclasa, la fosfodiesterasa, protein-quinasa. Agregando cAMP exógeno a un medio de cultivo, el hongo crece en la forma levadura en condiciones en que debiera crecer como micelio<sup>313</sup>. En la levadura los niveles de cAMP son mucho más altos que en el micelio, y esto se relacionó con las actividades de fosfodiesterasa y adenilato ciclasa<sup>314</sup>. El elevamiento del nivel de cAMP activaría una proteinquinasa cAMP dependiente<sup>315, 316</sup>.

En la tabla 2 se resumen una serie de diferencias entre las dos formas de *Mucor*.

	MICELIO	LEVADURA
ATMOSFERA	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>
GLUCOSA < 0,01%	+	-
EDTA, (ALTA CONC.)	+	-
KCN > 6 mM	-	+
PIRUVATOQUINASA	NO ACTIVABLE POR F6P	ACTIVABLE POR F6P
cAMP	POCO	MUCHO
SAM *	3 x	1 x
FACTOR DE ELONGA- CION 1 x *	MUY METILADO	POCO METILADO
+CICLOLEUCINA * (INHIBIDOR DE SAM)	-	+
GROSOR DE LA PARED CELULAR	1 µm	10 µm
CAPAS DE LA PARED	1	2
MANOSA EN LA PARED	1 x	6 x
PROTEINAS EN LA PARED	POCO	MUCHO
MANOPROTEINAS	CON MANOSA Y FUCOSA	SOLO MANOSA

\* *Mucor racemosus*

Tabla 2. Diferencias entre las formas levadura y micelio de *Mucor rouxii*.

#### V.4. S-ADENOSIL METIONINA Y DIMORFISMO EN *MUCOR RACE-NOSUS*:

Entre los muchos fenomenos que se han relacionado con el dimorfismo en Mucorales, parece tener importancia la regulación de los niveles de S-adenosil metionina (SAM) y la consiguiente metilación de macromoléculas. Se observó que los niveles intracelulares de SAM aumentaban notablemente (3 veces) con el cambio de la morfología de levadura a micelio<sup>317</sup>. Correlativamente no había cambios significativos en los niveles de espermidina, sintetizada a partir de putrescina y SAM. Si había en cambio mayor metilación de algunas proteínas. La proteína que era más metilada en la transición era el factor de elongación  $1\alpha$ <sup>318</sup>. Por otro lado, *Mucor race-nosus* no pasaba de la forma levadura a la micelar si se lo cultivaba en presencia de un inhibidor de la SAM sintetasa, la cicloleucina<sup>319</sup>.

Como veremos estos resultados son coherentes con los descritos en esta Tesis sobre metilación de glicoproteínas en *Mucor rouxii*.

#### V.5. POLIMEROS DE PARED CELULAR DE *MUCOR ROUXII*:

Con respecto a la pared celular existen también notorias diferencias entre la forma levadura y micelio.

La pared de la forma levadura es 10 veces más gruesa que de la micelar, constando la primera de dos capas y la última de una. En cuanto a su composición la pared de la levadura contiene 6 veces más manosa y más proteína que la micelar<sup>320</sup>. Los principales polímeros de pared son:

- 1) quitosano (poli-glucosamina)<sup>320</sup>.
- 2) quitina (poli-N-acetilglucosamina)<sup>320</sup>.
- 3) un complejo que puede constar de varios polímeros que

contiene alta proporción de ácido glucurónico y de manosa.

#### 4) glicoproteínas.

El complejo conteniendo ácido glucurónico fue separado en dos fracciones, siendo una poli-glucurónico y la otra un polímero de ácido glucurónico y manosa conteniendo pequeñas cantidades de galactosa y fucosa; a estos polímeros se los llamó ácido mucórico y mucorano respectivamente<sup>321</sup>. Por lo menos un 70 % del mucorano está constituido por la estructura repetitiva  $D\text{-Man} \rightarrow (1 \rightarrow 4) \rightarrow D\text{-GlcA} - (1 \rightarrow 3) - D\text{-Man} - (1 \rightarrow 3) \rightarrow$  <sup>322</sup>.

En cuanto a las glicoproteínas, se ha visto que su principal componente es manosa. Se han descrito glicoproteínas con pequeñas proporciones de galactosa y fucosa <sup>323</sup>. Un trabajo reciente describe manoproteínas que son más abundantes en la forma levadura. En esta forma contienen sólo manosa, mientras que en el micelio tienen también pequeñas cantidades de fucosa. La mayoría de los oligosacáridos están unidos en forma O-glicosídica, siendo menos de un 20 % N-glicosídicos (si bien no determinaron esta unión)<sup>324</sup>. Estos 'mañanos' tendrían una cadena principal de manosas con unión 1→6 a la cual estarían unidas cadenas laterales de 1 a 4 unidades de manosa, con unión 1→2 en la forma levadura, o una manosa con unión 1→2 seguida de otras con unión 1→6 en el micelio.

El hecho de que la levadura contenía 6 veces más manosa y mas proteínas que el micelio llevó a pensar que podría existir alguna diferencia en la biosíntesis de glicoproteínas (mananos) entre ambas formas, lo que llevó al estudio encarado en esta Tesis.

MATERIALES  
Y  
METODOS



## I. MATERIALES

### I.1. PRECURSORES RADIOACTIVOS:

[U- $^{14}$ C] Glucosa: 258,7 Ci/mol  
[1,6- $^3$ H] Glucosamina: 31,1 Ci/mmol  
L- [Metil- $^{14}$ C] metionina: 54,06 Ci/mol  
UDP [U- $^3$ H] Glc: 8 Ci/mmol  
UDP [U- $^{14}$ C] Glc: 258 Ci/mol  
UDP [U- $^{14}$ C] GlcNAc: 300 Ci/mol  
GDP [U- $^{14}$ C] Man: 216,5 Ci/mol  
UDP [U- $^{14}$ C] Gal: 284 Ci/mol

Los azúcares eran de New England Nuclear (N.E.N.). Los nucleótido-azúcares fueron preparados en el Instituto a partir de los azúcares marcados de NEN y los nucleótidos correspondientes. En algunos casos se usaron productos de Amersham.

### I.2. ENZIMAS:

-Endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa H (Endo H) de *Streptomyces griseus* de Miles.  
-Proteasa tipo XIV de *Streptomyces griseus* de Sigma.  
- $\alpha$ -Manosidasa de "Jack bean" de Sigma.  
- $\beta$ -Galactosidasa de *E.coli* N 5635 de Sigma.  
- $\alpha$ -Galactosidasa de *L.cornutus* de Sigma.  
- $\beta$ -Glucosidasa de almendra de Miles.  
- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa de "Jack bean" N 2269 de Sigma.

### I.3. STANDARDS:



I.3.a) [ $^{14}\text{C}$ ]Glc-P-Dol, [ $^{14}\text{C}$ ]Man-P-Dol y [ $^{14}\text{C}$ ]GlcNAc-P-P-Dol:

Fueron preparados *in vitro* a partir de microsomas de hígado de rata, y los nucleótido-azúcares correspondientes con agregado de Dol-P de hígado de cerdo según Behrens y Tabora<sup>328</sup>

La mezcla de incubación contenía:

-buffer Tris-maleato pH 7,7 \_\_\_\_\_ 100 mM  
-Dol-P \_\_\_\_\_ 0,5 umoles  
-EDTA-Na \_\_\_\_\_ 20 mM  
-β-Mercaptoetanol \_\_\_\_\_ 100 mM  
-NDP-azúcar \_\_\_\_\_  $5 \times 10^5$  dpm  
-Tritón-X-100 \_\_\_\_\_ 0,6 %  
-MgCl<sub>2</sub> \_\_\_\_\_ 30 mM  
-Microsomas de hígado de rata

Volumen final: 50 µl

Se incubó por 15-30 minutos a 37°C, deteniendo la reacción por agregado de cloroformo, metanol, agua hasta llegar a proporciones finales 3:2:1 respectivamente. Se purificaron de la fase inferior orgánica, como se describe luego para Dol-P-monosacáridos de *N.rouxii*.

I.3.b) [ $^{14}\text{C}$ ]Gal-P-undecaprenol:

Fue preparado a partir de una enzima particulada de *Acetobacter xylinus* y de UDP[ $^{14}\text{C}$ ]Gal. La incubación contenía:

-buffer Tris-HCl \_\_\_\_\_ 70 mM  
-Tritón-X-100 \_\_\_\_\_ 0,6 %  
-MgCl<sub>2</sub> \_\_\_\_\_ 10 mM  
-UDP[ $^{14}\text{C}$ ]Gal \_\_\_\_\_  $3 \times 10^5$  dpm

-79-

-Enzima de *A.xylinus*

Se incubó por 120 minutos a 30 °C. Se interrumpió la reacción por agregado de butanol saturado hasta una proporción final de butanol/agua 1:1. Undecaprenol-P-Gal fue extraído en la fase orgánica, que fue lavada 3 veces con 100 µl de agua<sup>324</sup>.

I.3.c) [<sup>14</sup>C]Gal-P-Dol:

No se ha encontrado hasta ahora en eucariotes. Fue por lo tanto preparado a partir de la enzima de *A.xylinus* en las condiciones descriptas para [<sup>14</sup>C]Gal-P-undecaprenol, pero con el agregado de Dol-P, según Iñon de Iannino et al<sup>327</sup>.

I.3.d) [<sup>3</sup>H-glucosa] o [<sup>14</sup>C-glucosa]Glc<sub>1</sub>-αMan<sub>4</sub>-  
-GlcNAc<sub>2</sub>-P-P-Dol:

Se prepararon por incubación de microsomas de hígado de rata con UDP[<sup>3</sup>H]Glc o UDP[<sup>14</sup>C]Glc, con un procedimiento similar al usado para preparar dolicol-P-monosacáridos<sup>328</sup>.

Luego de la partición con cloroformo/metanol/agua 3:2:1, se purificaron los dolicol-P-P-oligosacáridos de la interfase proteica, como está descripto más adelante para los compuestos correspondientes de *Mucor rouxii*.

I.3.e) [<sup>3</sup>H-glucosa] o [<sup>14</sup>C-glucosa]Glc<sub>1</sub>-αMan<sub>4</sub>-  
-GlcNAc<sub>2</sub>:

Se obtuvieron por hidrólisis ácida suave (HCl 0,02 N a 100°C por 15 min.) de los Dol-P-P-oligosacáridos preparados con microsomas de hígado de rata.

I.3.f) [U-<sup>14</sup>C]Glc<sub>1</sub>-→Man→GlcNAc<sub>2</sub> y [U-<sup>14</sup>C]Man<sub>2</sub>-→-GlcNAc<sub>2</sub>:

Se prepararon por incubación *in vivo* de [U-<sup>14</sup>C]glucosa con cortes de tiroides de perro. Se usaron unos 3 g de tejido cortado en fetas de 0,1 mm de espesor, incubando con 200 µCi de [U-<sup>14</sup>C]glucosa por 60 minutos a 37°C en 6 ml de solución conteniendo aminoácidos y vitaminas (medio MEM), siguiendo un procedimiento similar al descrito por Spiro et al<sup>327</sup>.

Se purificaron los dolicol-P-P-oligosacáridos como está descrito más adelante para los compuestos de *Mucor rouxii*. Luego éstos se sometieron a hidrólisis ácida suave para obtener los oligosacáridos.

I.3.g) [U-<sup>14</sup>C]Man<sub>4</sub>-→GlcNAc:

Se incubaron cortes de oviducto de gallina ponedora con 200 µCi de [U-<sup>14</sup>C]glucosa por 2 horas en condiciones similares a las de incubación de tiroides<sup>330</sup>.

Se purificaron glicoproteínas separando oligosacáridos de tipo polimanoza con unión N-glicosídica por acción de Endo H, como se describe más adelante para los compuestos de *Mucor rouxii*.

I.3.h) Manoligosacáridos: Man<sub>2</sub>, Man<sub>3</sub>, Man<sub>4</sub>:

Se obtuvieron por acetólisis parcial de manano de *S.cerevisiae*<sup>331</sup>.

I.3.i) Azúcares metilados:

-Monometilados: 2-, 3-, 4- y 6-O-metilglucosa eran de Supel-

co. Por reducción con  $\text{NaBH}_4$  se obtuvieron los derivados respectivos de sorbitol.

-Dimetilados:  $[\text{U-}^{14}\text{C-}]\alpha\text{-manosa}$  3,4 di-O-metilmanosa se obtuvo por permetilación e hidrólisis de manano de *S.cerevisiae*.

-Trimetilados: 2,4,6 y 3,4,6 tri-O-metilmanosa se obtuvieron por permetilación e hidrólisis de los manoligosacáridos.  $[\text{U-}^{14}\text{C-}]\alpha\text{-manosa}$  2,3,4 tri-O-metilmanosa se obtuvo por permetilación e hidrólisis de manano de una mutante de *S.cerevisiae* que no tenía cadenas laterales unidas al tronco de manosas con unión 1-6  $\alpha\alpha$ .  $[\text{3H-glucosa}]$  3,4,6 tri-O-metilglucosa se obtuvo por permetilación e hidrólisis de  $[\text{3H-glucosa}]\text{Glc}\rightarrow\text{Man}\rightarrow\text{GlcNAc}$  preparado con microsomas de hígado de rata.

-Tetrametilados: 2,3,4,6 tetra-O-metilmanosa se obtuvo por permetilación e hidrólisis de manoligosacáridos.  $[\text{3H-glucosa}]$  2,3,4,6 tetra-O-metilglucosa se obtuvo por permetilación e hidrólisis de  $[\text{3H-glucosa}]\text{Glc}\rightarrow\text{Man}\rightarrow\text{GlcNAc}$ .



## II - METODOS

### II.1. DEGRADACIONES ENZIMATICAS:

#### II.1.a) PROTEASA:

Se utilizó proteasa tipo XIV de Sigma pues está libre de glicosidasas. Se incubaron proteínas delipidadas y lavadas exhaustivamente con metanol y luego con agua en 3 ml de buffer Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 y 2 mM CaCl<sub>2</sub> con 2 mg de proteasa (10 U). Las incubaciones se realizaron en atmósfera de tolueno de 4 a 8 días a 37°C, agregando 2 mg de enzima cada 2 días. Luego se agregó TCA hasta un 10 % de concentración final centrifugando a 2000 RPM por 5 minutos tomando el sobrenadante. Se extrajo 5 veces con 6 volúmenes de eter etílico. Alternativamente se llevó a ebullición la mezcla de incubación durante 5 min. centrifugando luego y tomando el sobrenadante.

Se llevó a neutralidad con NH<sub>4</sub>OH y se concentró bajo corriente de nitrógeno hasta 1,5 ml. Se agregó 0,5 ml de azul de dextrano (PM=2.000.000) y se sembró sobre una columna de Bio-Gel P6, cromatografiandose como está descripto en la sección B.II.9.

#### II.1.b) ENDO- $\beta$ -N-ACETILGLUCOSAMINIDASA H:

Se incubaron glicopéptidos disueltos en 250  $\mu$ l de buffer trietilamina-acetato 0,05 M pH=5,5 con 0,003 U de la enzima a 37°C por uno o dos días. Luego se llevó a seco con corriente de N<sub>2</sub> a 50°C y se sembró en papel para someter los productos a electroforesis como se indica en la sección B.II.14.

#### II.1.c) $\alpha$ -MANOSIDASA:

Se dializó la enzima durante 5 ó 6 hs. contra 0,05 M citrato de sodio, pH 4,5 en presencia de 0,5 mM acetato de zinc. Se incubaron luego los oligosacáridos secos con 70-100  $\mu$ l de la solución de enzima dializada (0,3 U). La incubación se realizó durante una noche a 37°C. Luego se pasó por una columna conteniendo 1 ml de resina de intercambio mixta MB3 en la forma acetato y protónica. Se concentró el eluido bajo corriente de nitrógeno o aire a 50°C, sembrando en papel y cromatografiando como se indica en cada caso.

#### II.1.d) $\beta$ -GLUCOSIDASA:

Se incubaron oligosacáridos disueltos en 200  $\mu$ l de buffer acetato de sodio / acético 0,1 M, pH 5,0 con 0,1 U de la enzima a 35°C durante una noche. Se llevó a seco con corriente de nitrógeno y se agregó  $\alpha$ -manosidasa siguiendo el procedimiento descrito en cada caso.

#### II.1.e) $\beta$ -N-ACETILGLUCOSAMINIDASA:

Se incubaron oligosacáridos disueltos en 200  $\mu$ l de buffer citrato de sodio 0,05 M, pH 5 con 0,1 U de la enzima a 37 °C durante una noche. Luego se pasaron por una resina de intercambio mixta MB3; se sembraron en papel y cromatografiaron.

#### II.1.f) $\beta$ -GALACTOSIDASA:

Se incubaron oligosacáridos disueltos en 120  $\mu$ l de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 M, pH 7,4 conteniendo  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 M y  $\text{MgCl}_2$  0,003 M con 0,1 U de la enzima a 37°C por dos días. Se pasó luego por una resina de intercambio mixta MB3 y se sembró en papel para cromatografiar.

**II.1.g)  $\alpha$ -GALACTOSIDASA:**

Se incubaron oligosacáridos disueltos en 150  $\mu$ l de buffer citrato de sodio 0,05 M, pH 5 conteniendo acetato de cinc  $5 \times 10^{-4}$  M con 0,1 U de la enzima a 37°C durante una noche. Se pasó luego por una resina de intercambio mixta MB3 que se sembró en papel para cromatografiar.

Las glicosidasas fueron ensayadas con los p-NO<sub>2</sub>-fenil glicósidos correspondientes, midiendo la liberación de p-NO<sub>2</sub> fenol.

**II.2. HIDROLISIS:****II.2.a) HIDROLISIS ACIDA SUAVE (PARA LIPIDO-AZUCARES):**

Se llevó a seco la muestra bajo corriente de N<sub>2</sub> a 30°C. Se agregó 0,5 ml de HCl 0,02 N y se trató a 100°C por 15 min. tapando el tubo con bolita de vidrio. Luego se particionó agregando 1,5 ml de cloroformo y 1 ml de metanol, tomando la fase superior. Esta se llevó a seco evaporando a 30°C bajo corriente de nitrógeno, y se eliminó el HCl por evaporación repetida (con agregado de agua). Se sembró en papel o en placa delgada para cromatografiar.

**II.2.b) HIDROLISIS ACIDA SUAVE (PARA FURANOSAS Y DESOXIAZUCARES):**

La muestra se llevó a seco bajo corriente de N<sub>2</sub> o aire y se agregó 1 ml de HCl 0,1 N. Se hidrolizó en un tubo con tapa de cierre hermético de Teflón por 2 hs. a 100°C. Se eliminó el HCl por evaporación repetida (con agregado de agua) a 50°C bajo



corriente de  $N_2$  o aire, y se sembró en papel para cromatografiar.

#### II.2.c) HIDROLISIS ACIDA PARCIAL:

Se procedió como en (b) pero utilizando HCl 0,5 N por 3 hs. a 100°C.

#### II.2.d) HIDROLISIS ACIDA TOTAL:

Se procedió como en (b) pero utilizando HCl 1 N por 4 hs. a 100°C.

#### II.2.e) HIDROLISIS ALCALINA SUAVE (SAPONIFICACION):

Los lípidos se llevaron a seco a 30°C bajo corriente de  $N_2$ . Se disolvieron en 2 ml de cloroformo + 0,7 ml de metanol, llevando a concentración 0,2 N de NaOH con NaOH 10 N. Se trató a 37°C durante 10 minutos. A continuación se particionó agregando 0,8 ml de metanol y 0,66 ml de agua, tomando la fase inferior. Esta se lavó dos veces con 0,6 ml de agua. La fase inferior resultante se concentró bajo corriente de  $N_2$  a 30°C y sembró en DEAE-celulosa o en placa delgada, según el caso.

#### II.2.f) HIDROLISIS ALCALINA SUAVE (PARA DE-O-ACETILACION):

Se disolvió el oligosacárido en 1 ml de NaOH 0,02 M. Se dejó 2 hs. a 37°C. Luego se neutralizó pasando por una resina Dowex 50 H+. Se llevó a seco y trató con  $\alpha$ -manosidasa como se indica en Resultados.

### II.2.g) HIDROLISIS ALCALINA FUERTE (PARA DE-N-ACETILACION):

Se disolvió el oligosacárido (previamente reducido con  $\text{NaBH}_4$ ) en 300  $\mu\text{l}$  de KOH 2 N. Se trató a 100°C por 120 min. en tubo con tapa con cierre hermético de Teflón. Se neutralizó con ácido perclórico y centrifugó eliminando el  $\text{KClO}_4$  precipitado. Se llevó a seco el sobrenadante a 50°C con corriente de  $\text{N}_2$  o aire. Se sembró en papel para electrofóresis.

### II.3. DEGRADACION CON FENOL:

Se llevó el lípido a seco. Se agregaron 150  $\mu\text{l}$  de fenol 99,5 % y 150  $\mu\text{l}$  de agua y se trató a 70°C por los tiempos que se indican en cada caso. Finalmente se agitó y centrifugó separando la fase acuosa de la fenólica. Esta última se lavó dos veces con 100  $\mu\text{l}$  de agua. Las fases acuosas juntas se lavaron con 100  $\mu\text{l}$  de fenol y finalmente con 100  $\mu\text{l}$  de éter. Se contó cada fase agregando solución centelleadora de Bray <sup>324</sup>.

### II.4. ACETOLISIS:

#### II.4.a) Acetilación:

El oligosacárido (previamente tratado con Endo H) (alrededor de 5000 cpm) se disolvió en 0,5 ml de piridina + 0,5 ml de anhídrido acético. Se trató a 100°C por 3 hs. en tubo con tapa de cierre hermético de Teflón, (en el caso de oligosacáridos grandes (>20 unidades) esta acetilación se prolongó por hasta 8 hs.). Se eliminaron luego los reactivos por evaporación con 1 ml de tolueno y luego dos veces con 1 ml de etanol absoluto, a 50 °C bajo corriente de  $\text{N}_2$ .

#### II.4.b) Acetólisis:

Se agregó al oligosacárido acetilado seco 0,5 ml de anhídrido acético, 0,5 ml de ácido acético glacial, y 0,05 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se dejó a 37 °C por 10 hs. Se interrumpió la acetólisis agregando 2 ml de piridina. Se llevó a seco bajo corriente de N<sub>2</sub>, agregando 2 veces 1 ml de tolueno. Se particionó luego agregando 2,5 ml de cloroformo y 2,5 ml de agua. La fase superior se lavó con 2,5 ml de cloroformo. Las fases inferiores juntas se lavaron con 2 ml de agua. Las fases acuosas se descartaron, y las fases clorofórmicas se evaporaron a seco bajo corriente de N<sub>2</sub> a 50°C.

#### II.4.c) De-O-acetilación:

Los productos de la acetólisis se secaron evaporando tres veces con 2 ml de etanol absoluto. Se agregaron 2 ml de solución recién preparada de metóxido de sodio 0,05 N. Se dejó 20 minutos a temperatura ambiente. Se interrumpió la reacción por agregado de 1 ml de Dowex 50 H<sup>+</sup>. Se centrifugó y lavó la resina tres veces con 1 ml de agua. Finalmente se pasó la solución por una resina de intercambio mixta MB3 (en la forma H<sup>+</sup>/acetato). Se evaporó bajo corriente de N<sub>2</sub> y se sembró en papel para cromatografiar. En algunos casos, previo a la cromatografía se sometieron los productos a electroforesis en papel en acetato de piridina para terminar de eliminar las sales.

Este método se basa en el descrito por Kocourek y Ballou<sup>6e</sup>.

#### II.5. OXIDACION CON PERIODATO:

**II.5.a) Derivados de dolicol:**

Se trataron los lípido-azúcares con 0,5 ml de 0,1 M metaperiodato de sodio conteniendo Tritón X-100 0,1 % en la oscuridad por 48 hs. a 4°C. Se agregó luego 20 µl de etilenglicol dejando las muestras a temperatura ambiente por 30 min. Se realizó luego una partición con cloroformo/ metanol/ agua 3:2:1 sembrando las fases inferiores en placa delgada y cromatografiando en solvente G. En algunos casos se realizó la cromatografía a 4°C <sup>2,331</sup>.

**II.5.b) Monosacaridos:**

Los azúcares fueron convertidos en sus metil-glicósidos calentando en 1 ml de metanol absoluto en presencia de 0,5 ml de resina Dowex 50 H+ X8 seca. Se dejaron 2 hs. a 100°C en tubos con cierre hermético de Teflón. Los metil-glicósidos obtenidos fueron separados de azúcar sin reaccionar por cromatografía en papel en solvente C. Se eluyeron luego del papel con agua y se trataron con 0,5 ml de 0,1 M metaperiodato de sodio a 4°C en la oscuridad por 48 hs. Se interrumpió la reacción con etilenglicol a temp. ambiente durante 30 minutos. Se redujo entonces con 1 ml de 0,1 M NaBH<sub>4</sub>. Se pasó por una resina Dowex 50 H+ y luego se evaporó repetidamente con corriente de aire a 50°C con agregado de 0,5 ml de metanol cada vez, para eliminar el ácido bórico. Se agregó luego 1 ml de HCl 1 N calentando a 100°C por 4 hs <sup>331</sup>. El HCl se eliminó con corriente de aire a 50°C evaporando repetidamente con agregado de 0,5 ml de agua. El producto se sembró en papel para cromatografiar.

**II.6. ANALISIS DE METILACION:**

Se utilizó el método de Hakomori<sup>74</sup> con las modificaciones de Li et al.<sup>72</sup>.

#### II.6.a) Preparación de dimetilsulfinil carbanión (DMSC<sup>-</sup>):

- Dimetilsulfóxido (Fluka): se agitó con  $H_2Ca$  durante un día y se destiló como indica Ielpi<sup>332</sup>. Se conservó seco con tamices moleculares (molecular sieves) de 3 Å.
- Hidruro de sodio (BDH): conservado en desecador al vacío.
- Ioduro de metilo (Fluka): conservado en la oscuridad a 5°C.

Se trataron 15 ml de DMSO destilado anhidro con 2 g (exceso) de HNa durante 3 horas a 75°C en atmósfera de nitrógeno. La suspensión se centrifugó y el sobrenadante (verduzco) se conservó con una capa de vaselina bajo atmósfera de  $N_2$  a -20 °C, pudiéndose guardar así durante varios meses.

#### II.6.b) Permetilación de oligosacáridos:

El oligosacárido seco (1000-10000 cpm) se suspendió en 200 µl de DMSO manteniendo el tubo 1 minuto en baño ultrasónico. Se agregaron entonces 200 µl de DMSC<sup>-</sup> y se mantuvo la mezcla por 120 minutos a temperatura ambiente bajo corriente de  $N_2$  y con agitación.

Se agregaron luego, manteniendo la mezcla en baño de hielo, 200 µl de ioduro de metilo, dejando 30 min. a temperatura ambiente bajo corriente de  $N_2$ .

Se particionó con 2 ml de cloroformo + 2 ml de agua. La fase acuosa se extrajo 2 veces con 2 ml de cloroformo, y las fases orgánicas juntas se lavaron 3 veces con 2 ml de agua, tras lo cual se secaron bajo corriente de  $N_2$ .

**II.6.c) Hidrólisis:**

Los productos permetilados se hidrolizaron con HCl 1 N por 4 hs. a 100°C en tubo con cierre hermético. Se pasó por una pequeña columna de resina de intercambio mixta MB3 en la forma H<sup>+</sup>/acetato y se evaporó bajo corriente de N<sub>2</sub> a 50°C.

**II.6.d) TLC:**

Se sembraron los productos en placa delgada. Se agregó a esta placa delgada una tira de papel Whatman 3 MM en la parte superior y se corrió con solvente H hasta un frente de 28-29 cm.

**II.7. DESETERIFICACION (DEMETILACION):**

Los compuestos secos se suspendieron en 0,5 ml de diclorometano (secado con tamices moleculares), manteniendo 1 minuto en baño ultrasónico. Se enfrió a -70°C en baño de hielo seco y acetona y se agregaron 50 µl de tribromuro de boro. Se dejó 30 min. a -70°C y luego 18 hs. a temperatura ambiente. La reacción se interrumpió agregando 1 ml de agua y 1 ml de cloroformo. Se secó la fase superior y se eliminó el ácido bórico por evaporación repetida con metanol a 50°C bajo corriente de aire. Los productos se cromatografiaron en papel en solvente C <sup>240</sup>.

**II.8. REDUCCION CON BOROHI DRURO DE SODIO:**

Se disolvieron los azúcares en 0,5 - 1 ml de NaBH<sub>4</sub> 0,1 o 0,2 M manteniendo a temperatura ambiente durante una noche (en algunos casos se agregó una gota de hidroxido de amonio concentrado para asegurar un medio alcalino). Se interrumpió y se eliminaron los iones Na<sup>+</sup> agregando 1 ml de Dowex 50 H<sup>+</sup> y pasando

por una columna (0,5 x 5 cm) de la misma resina. Se evaporó luego cinco veces con 1 ml de metanol anhidro a 50°C bajo corriente de aire o N<sub>2</sub> para eliminar el ácido bórico remanente.

#### II.9. CROMATOGRAFIA EN BIOGEL P6:

Se utilizó una columna de 1,25 x 120 cm llena con resina Bio-Gel P6, 100-200 Mesh equilibrada con buffer acetato de piridinio 0,1 M, pH 5,0. El mismo buffer se usó para desarrollo y elución. El volumen de exclusión se determinó con azul de dextrano (PM  $2 \times 10^6$ ). Se sembraron muestras de 1,5 ml (con azul de dextrano) y se colectaron fracciones de 1,8 ml. Se midió radioactividad en alícuotas de 25 - 250  $\mu$ l de las fracciones recogidas. Las fracciones de interés se juntaron y evaporaron en evaporador rotatorio a 30 - 40 °C a presión reducida, o bajo corriente de aire a 50°C.

#### II.10. CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G75:

Se utilizó una columna de 2,0 x 75 cm llena con Sephadex G75 y con camisa exterior a 40°C. La columna se equilibró con buffer fosfato de sodio 0,05 M, pH 7,6 conteniendo 0,5 % de desoxicolato de sodio. Se eluyó con la misma solución.

Los lípido-azúcares en solvente orgánico se llevaron a seco y se disolvieron en 0,5 ml de solución conteniendo buffer fosfato 10 mM, pH 7,6 con 3 % de desoxicolato de sodio y azul de dextrano, y se sembró en la columna. Se recogieron fracciones de 2,2 ml y se midió radioactividad en alícuotas de 1 ml <sup>102</sup>.

#### II.11. CROMATOGRAFIA EN DEAE-CELULOSA:

II.11.a) Para dolicol-P-monosacáridos:

Se utilizaron columnas de 0,5 x 6 cm hechas con pipetas Pasteur y llenas con DEAE-celulosa en la forma acetato, equilibradas con cloroformo/metanol 2:1. Se sembraron las muestras disueltas en 200  $\mu$ l de cloroformo/metanol 2:1. Se eluyó con gradiente discontinuo de formiato de amonio en el mismo solvente, en las concentraciones que se indican en el texto. Se recogieron fracciones de 1 ml y se contaron alícuotas de 50  $\mu$ l en mezcla centelleante de Bray. Alternativamente se secaron estas alícuotas sobre chapitas de aluminio y se contaron en un escalímetro.

#### II.11.b) Para dolicol-P-P-oligosacáridos:

Se realizó el mismo procedimiento que en (a), pero utilizando cloroformo/metanol/agua 10:10:3 como solvente en vez de cloroformo/metanol 2:1.

#### II.12. CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA (TLC):

Se utilizaron placas de silicagel G60 de 0,25 mm de espesor y 20 cm de longitud de Merck. Se utilizaron los solventes: E, F, G y H. (ver sección B.II.16).

Con el solvente H se agregó al final de la placa una tira de papel Whatman 3 M firmemente adosado, y se dejó correr el frente unos 9 cm por esta tira.

Las cromatografías se desarrollaron a temperatura ambiente salvo en el caso del solvente E, con el que se realizaron a 37°C, y con el solvente G, que en los casos indicados se realizaron a 4°C.

El revelado de azúcares y azúcares metilados se realizó con 5 % de ácido sulfúrico en etanol. Para medición de radioactividad se rasparon secciones de 0,5 o 1 cm del



cromatograma agregando a estas fracciones solución centelleante con base de tolueno y contando. Alternativamente se autorradio-grafiaron las placas.

Para eluir sustancias de las placas se rasparon los sitios donde aparecía la mancha de interés, y las partículas de silicagel se agitaron unos minutos en el solvente que se indica en cada caso. El silicagel se eliminó por centrifugación y filtración por algodón.

#### II.13. CROMATOGRAFIA EN PAPEL:

Se utilizó papel Whatman 1 o su equivalente SS2043a de Schleicher & Schull. En algunos casos, con cantidades mayores de sustancias, se usó papel Whatman 3 MM. Los cromatogramas fueron descendentes, y los solventes utilizados: A, por 3 a 7 días. B, por 40-48 hs. C, por 24-40 hs. D, por 3 a 6 días.

El revelado de azúcares se realizó con solución alcalina de nitrato de plata.

Se midió radioactividad cortando tiras de 1 o 0,5 cm de ancho y contando con solución de centelleo con base en tolueno. Alternativamente se pasaron los cromatogramas por un detector de barrido (scanner).

Para eluir azucares radioactivos del cromatograma, si éste había sido contado con solución de centelleo de tolueno, se lavaron las tiras de papel con tolueno, para eliminar el PPO y el POPOP, y se secaron con secador de cabello. Las tiras se colocaron en una pequeña columna (por ej. pipeta Pasteur), y se compactaron. Se pasaron entonces por la columna entre 2 y 5 ml de agua.

#### II.14. ELECTROFORESIS EN PAPEL:

Se utilizó el papel descripto para cromatografía en papel. Asimismo, se usó el mismo procedimiento para revelado de azúcares, medición de radioactividad y elución.

El equipo utilizado consistía de dos cubetas con electrodos de platino. En ésta se colocó el solvente de corrida y se sumergieron las puntas del papel (generalmente de 60 cm de largo). El enfriamiento del papel fue por inmersión en una cuba con  $\text{CCl}_4$  o varsol.

Se usaron:

- solvente I durante 2 hs. a 1500 V ó a 1100 V durante 3 hs.
- solvente J a 1000 V por 4 hs.
- solvente K a 2000 V por 90 min.
- solvente L a 1000 V por 1 h.
- solvente M a 1200-2000 V por 3-4 hs.
- solvente N a 1400 V por 90 min.

#### II.15. HPLC:

Se utilizó un equipo Waters con dos bombas 6000 A y hacedor de gradientes 660. Se usó una columna Lichrosorb  $\text{NH}_2$  (4,6 x 250 mm) con partículas de 10  $\mu\text{m}$  de Merck. Los oligosacáridos se sembraron disueltos en 50  $\mu\text{l}$  de solvente D y se corrió con el mismo solvente a un flujo de 1 ml/min. Se colectaron fracciones de 0,5 ml y se contaron con solución de centelleo de Bray.

#### II.16. SOLVENTES:

- A) 1-propanol/ nitrometano/ agua 5:2:4.
- B) 1-butanol/ piridina/ agua 4:3:4.
- C) 1-butanol/ piridina/ agua 6:4:3.
- D) 1-butanol/ piridina/ agua 10:3:3.

- E) 1-propanol/ agua 7:3.
- F) cloroformo/ metanol/ agua 65:25:4.
- G) cloroformo/ 2-propanol/ etanol/ ácido acético glacial 2:2:3:1
- H) benceno/ acetona/ amoníaco conc./ agua 100:400:3:6.
- I) ácido fórmico 5 %.
- J)  $\text{NaHCO}_3$ /  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,2 M, pH 10,1.
- K) acetato de piridina 1,0 M, pH 6,5.
- L) molibdato de sodio 0,1 M, pH 5,0.
- M) tetraborato de sodio 50 mM, pH 9,5.
- N) tetraborato de sodio 15 mM, pH 9,5.
- O) acetonitrilo/ agua 58:42.

## II.17. MEDICION DE RADIOACTIVIDAD:

Para medidas de barrido se utilizó un radiocromatógrafo de barrido Packard modelo 7201. (scanner)

Para contar muestras en seco se utilizó un escalímetro Alfa-Nuclear modelo STP.

Para emisión  $\beta$  ( $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$ ) se utilizaron contadores de centelleo Packard Tri-carb modelos 2002 y 2003 y Beckman modelo 8100. Se utilizaron las siguientes soluciones de centelleo:

a) Solución con base de tolueno: (para soluciones no acuosas):

0,75 g de dimetil POPOP + 15 g de PPO en 3 l de tolueno. Normalmente se agregaron a cada vial unos 200  $\mu\text{l}$  de esta solución.

b) Solución de Bray: (para soluciones acuosas):<sup>333</sup>

180 g de naftaleno

12 g de PPO

0,6 g de dimetil-POPOP  
600 ml de metanol  
60 ml de etilenglicol  
completado a 3 l con dioxano

Se usaron 3 ml de esta solución por vial para no más de 1 ml de solución acuosa.

En el caso de medir proteínas, éstas se solubilizaron con 200  $\mu$ l de solubilizador de tejidos SOLUENE de Packard (base fuerte en tolueno) durante 10 min. a 60-90 °C. Luego se neutralizó con 10  $\mu$ l de ácido acético glacial. Se contó entonces con solución con base de tolueno.

#### II.18. AUTORADIOGRAFIA:

Se utilizaron películas KODAK X-Omat R. Las exposiciones se efectuaron a temperatura ambiente durante 7 a 15 días. En algunos casos (al trabajar con poca radioactividad) se pre-expusieron las placas con un flash para hacerlas más sensibles.

El revelador usado se preparó según fórmula de KODAK. Se usó ácido acético 2 % como detenedor y fijador de KODAK.



### III. EXPERIMENTAL

#### III.1. CULTIVOS:

Se utilizó la cepa NRRL 1894 de *Mucor rouxii* gentilmente cedida por la Dra. S. Passeron, Depto. de Química Biológica, FCEyN, UBA.

##### III.1.a) OBTENCION DE ESPORAS:

Se cultivaron esporas sobre agar 5%/ jugo de tomate 1:1 en botellas de Roux (200-400 esporas en 2 ml por botella) a 28° C. Luego de 4 ó 5 días creció micelio con hifas aéreas esporuladas. Las esporas se cosecharon agregando 20 ml de agua por botella y filtrando por media de nylon para retener el micelio. (Todo en condiciones de esterilidad). Se lavaron las esporas 2 veces con agua destilada cosechando por centrifugación a 3000 RPM por 10 minutos a 4°C. Las esporas en agua destilada se podían guardar por 4 meses, tras lo cual se repicaban con el procedimiento descripto.

##### III.1.b) OBTENCION DE CELULAS DE MICELIO:

Se sembraron esporas ( $5 \times 10^5$  esporas/ml) en un medio conteniendo extracto de levadura 1 %, peptona 2 % y glucosa 2 % a pH 4,5 (medio YPG), en erlenmeyers de 2 l a razón de no más de 600 ml de medio en cada uno (para asegurar el oreo). Se cultivó con agitación a 28°C hasta la fase logarítmica tardía. Ésta se alcanzó después de 15 hs. de cultivo; se midió el crecimiento por turbidez determinada en un espectrofotómetro a 660 nm. Alcanzada esta fase se enfrió a 4°C y cosechó filtrando por papel de filtro común<sup>220</sup>.

### III.1.c) OBTENCION DE CELULAS LEVADURIFORMES:

Se siguió un procedimiento similar al de células de micelio con los siguientes cambios:

- El medio contenía 3 % de glucosa en vez de 2 %.
- Se cultivó con gaseo constante con CO<sub>2</sub> en erlenmeyers casi llenos.
- Se alcanzó la fase logarítmica tardía luego de 25 hs. de cultivo a 28°C. Alcanzada esta fase, se cosechó centrifugando a 2500 x g por 5 min. a 4°C <sup>320</sup>.

### III.1.d) OBTENCION DE CELULAS MICELARES EN MEDIO DEFINIDO:

Para poder incorporar [<sup>14</sup>C]metionina se siguió un procedimiento similar al del punto (a) pero utilizando el siguiente medio definido<sup>309</sup>:

glucosa_____2 %	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O___1 x 10 <sup>-4</sup> %
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> _____0,1 %	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O___0,3 x 10 <sup>-4</sup> %
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> _____0,3 %	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O___0,4 x 10 <sup>-4</sup> %
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O___0,05 %	Tiamina_____1 x 10 <sup>-4</sup> %
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O___1,8 x 10 <sup>-4</sup> %	A. nicotínico_1 x 10 <sup>-4</sup> %

Se llevó a pH 4,5. Se alcanzó la fase logarítmica tardía luego de 28-30 hs. de cultivo a 28°C.

### III.2. MARCACION RADIOACTIVA IN VIVO:

#### III.2.a) [U-<sup>14</sup>C]Glucosa:

##### III.2.a.i) Marcación continua:

Se lavaron las células con medio libre de hidratos de carbono (Yeast Nitrogen Base: YNB) (Difco), pH 4,5 varias veces y fueron resuspendidas en la misma solución. Se incubaron alícuotas (2 g en peso húmedo de células en 50 ml) a 28°C con agitación con 100-500 uCi de [U-<sup>14</sup>C]glucosa por los tiempos indicados en el texto. Se interrumpieron las incubaciones por agregado de ácido tricloroacético 100 % hasta una concentración final del 10 %. Simultáneamente se enfriaron los cultivos en hielo. Se lavaron entonces las células con 50 ml de agua helada cuatro veces y se rompieron con una prensa Biox-X-press.

#### III.2.a.ii) Pulso y chase:

En este caso, luego de incubar alícuotas con medio YNB durante 3 min. con 150 uCi de [U-<sup>14</sup>C]glucosa, se agregó glucosa no marcada hasta una concentración final de 2 %, enfriando simultáneamente en hielo. Se cosecharon las células y lavaron 2 veces con 50 ml de medio YPG. Se resuspendieron en 50 ml de medio YPG y se incubaron con agitación a 28°C para un chase por los tiempos indicados en el texto. Se interrumpieron luego los cultivos con ácido tricloroacético y se procesaron como en el caso (i).

#### III.2.b) [1,6-<sup>3</sup>H]N-acetilglucosamina:

Se procedió como fue descripto para [U-<sup>14</sup>C]glucosa. En este caso se usó [1,6-<sup>3</sup>H]glucosamina. Esta fue acetilada y luego de-O-acetilada, según el procedimiento detallado para acetólisis (sección B.II.4, partes (a) y (c)).

En cada incubación se utilizaron 100 µCi de [<sup>3</sup>H]N-acetilglucosamina en 50 ml de medio YNB durante 5 min. a 28 °C con



agitación. Se agregó entonces N-acetilglucosamina no marcada hasta una concentración final de 0,5 %, enfriando simultáneamente en hielo. Se cosecharon las células y lavaron dos veces con 50 ml de medio YPG. Se resuspendieron en 50 ml de medio YPG y se incubaron con agitación a 28°C para un *chase* por los tiempos indicados en el texto. Se interrumpieron luego los cultivos con ácido tricloroacético y se procesaron como en el caso de incorporación de [<sup>14</sup>C]glucosa.

### III.2.c) L-[*acetil*-<sup>14</sup>C]metionina:

#### III.2.c.i) Marcación continua:

Se cultivaron células de la forma micelar en un medio definido como fue descrito en la sección B.III.1.d. A las 10 hs. de comenzado el cultivo (fase logarítmica) se agregaron a 100 ml de cultivo 70 µCi de L-[*acetil*-<sup>14</sup>C]metionina. A las 14 hs. de incorporación (fase logarítmica tardía) se interrumpió agregando TCA hasta 10 % de concentración final, y se procesó como en los casos anteriores.

#### III.2.c.ii) Pulso y *chase*:

Se procedió como en (i) pero en este caso se cosecharon células de 100 ml de cultivo a las 13 hs. de iniciado éste. Se resuspendieron en 10 ml y agregaron 40 µCi de L-[*acetil*-<sup>14</sup>C]metionina incubando las células por 30 minutos a 28°C.

Se interrumpió enfriando en hielo, cosechando, lavando con el medio definido y resuspendiendo las células en 100 ml del mismo medio pero conteniendo 10 mg de metionina. El *chase* se realizó por los tiempos indicados interrumpiendo luego

con TCA hasta concentración final de 10 %. Se procesaron en forma similar a los casos anteriores.

### **III.3. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE DOLICOL-P-MONOSACARIDOS:**

#### **III.3.a) AISLAMIENTO:**

Las células rotas con Biox-X-press se extrajeron cuatro veces con 20 ml de cloroformo/ metanol/ agua 10:10:3. El precipitado (FELLET) fue reservado para el aislamiento de glicoproteínas. Los extractos juntados fueron evaporados en evaporador rotatorio a 37 °C. El residuo fue particionado con cloroformo/ metanol/ agua 3:2:1 (6 ml) con agregado de proteínas de hígado de rata ( 50 mg) como "carrier". La interfase resultante se re-particionó y se lavó luego 2 veces con 1 ml de fase superior teórica (cloroformo/ metanol/ agua 1:1:16). La interfase fue finalmente extraída cuatro veces con 0,5 ml de cloroformo/ metanol/ agua 10:10:3. Este extracto (1103) se reservó para purificación de los dolicol-P-P-oligosacáridos.

Las fases inferiores de las particiones anteriores fueron juntadas y lavadas con 1 ml de fase superior teórica dos veces, purificándose de ellas los dolicol-P-monosacáridos como se describe a continuación.

#### **III.3.b) PURIFICACION:**

Las fases inferiores de las particiones anteriores, lavadas, se evaporaron en evaporador rotatorio a presión reducida a 37 °C, y el residuo se sometió a saponificación suave (como se describió en la sección B.II.2.e). Se particionó luego con cloroformo/ metanol/ agua 3:2:1 y la fase inferior se evaporó a

presión reducida a 37°C. El residuo se disolvió en 200 µl de cloroformo/ metanol 2:1 y se cromatografió en DEAE-celulosa como fue descrito en la sección B.II.11.a, utilizando para elución un gradiente discontinuo de formiato de amonio con concentraciones de 0/ 0,01/ 0,02/ 0,06 y 1 M (ver fig. 26)<sup>144</sup>. (Ver esquema 1).

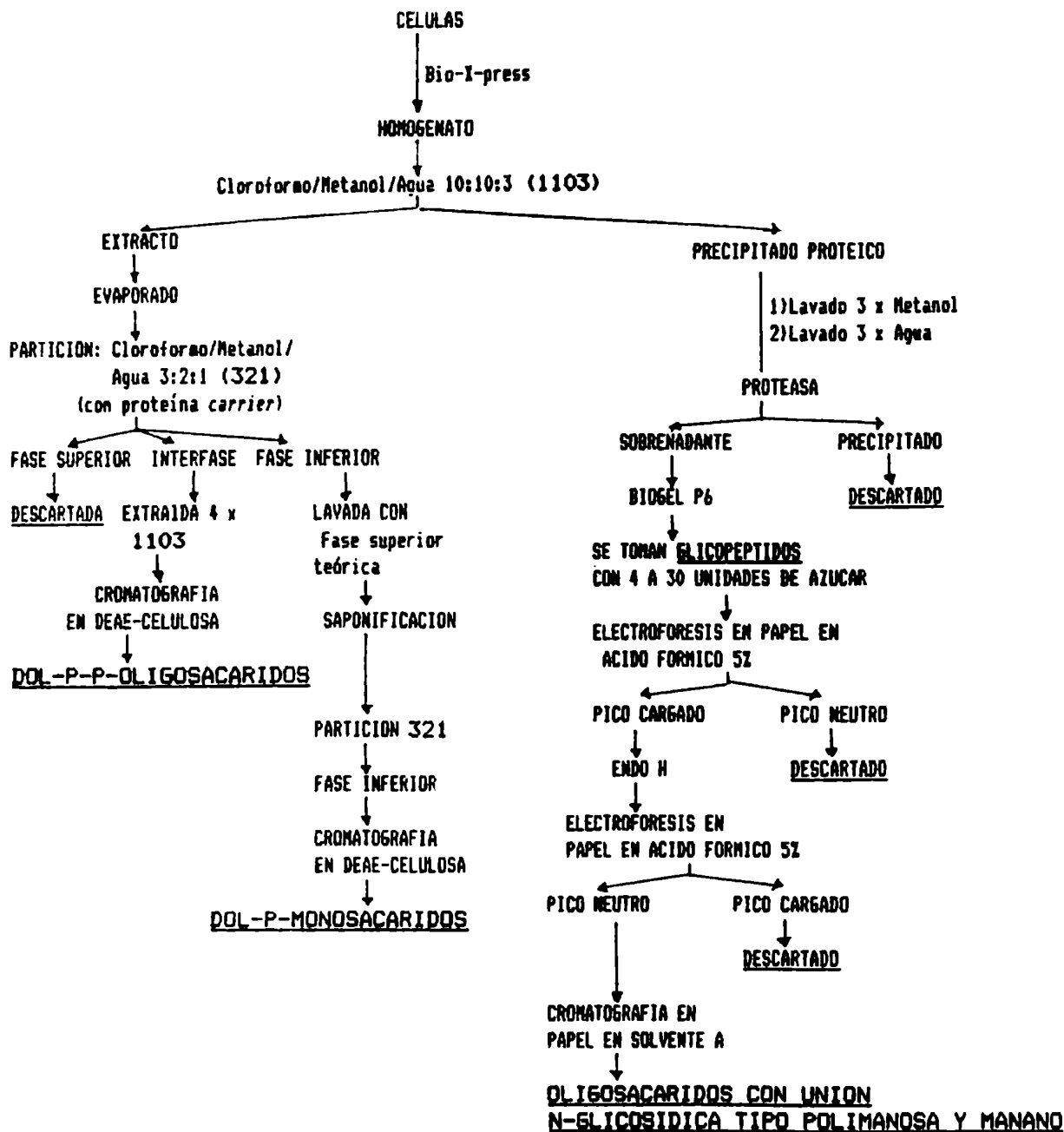
#### **III.4. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE DOLICOL-P-P-OLIGO-SACARIDOS:**

El extracto (1103) obtenido anteriormente fue evaporado a 37°C a presión reducida. El residuo fue disuelto en 200 µl de cloroformo/ metanol/ agua 10:10:3 y cromatografiado en columna de DEAE-celulosa como se describió en la sección B.II.11.b. En este caso se utilizó para la elución un gradiente discontinuo de formiato de amonio con concentraciones de 0/ 0,01/ 0,03/ 0,25 y 1 M. (Ver fig. 34).

#### **III.5. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE OLIGOSACARIDOS DE GLICOPROTEINAS:**

Los precipitados remanentes de la extracción de lípidos descripta (PELLET) (Ver esquema 1), fueron lavados con metanol (3 x 5 ml) para eliminar los restos de cloroformo y luego con agua (3 x 5 ml) para eliminar el metanol. Se incubaron entonces por 4 a 8 días con proteasa como se describió en la sección B.II.1.a. Se cromatografió luego por una columna de Biogel P6 como se describió y se juntaron las fracciones correspondientes a glicopéptidos con 4 a 30 unidades de azúcar. Las fracciones juntadas se evaporaron a presión reducida a 50°C y el residuo se sembró en papel. Se realizó entonces una electroforesis en ácido formico 5 %. Se tomó el pico cargado (fig. 43 B) y se eluyó con

acetato de piridina 0,1 M pH 5,0. Se evaporó bajo corriente de aire a 50 °C y se trató con Endo H como fue descrito. Se sometió el producto nuevamente a electroforesis en fórmico 5 % pero en este caso se tomó el pico neutro (oligosacáridos separados por Endo H) (fig. 43 C). Este pico se eluyó con agua, se evaporó bajo corriente de aire y se sembró en papel. Se cromatografió entonces en solvente A.



Esquema 1. Aislamiento y purificación de Dol-P-monosacáridos Dol-P-P-oligosacáridos y oligosacáridos con unión N-glicosídica a proteína.

## RESULTADOS



## 1. CARACTERIZACION DE DOLICOL-P-MONOSACARIDOS:

Para investigar la existencia de dolicol monofosfato monosacáridos *in vivo* se incubaron células de las formas levadura o micelio con [U- $^{14}$ C]glucosa por 5 minutos. Luego de rotas las células con una Biox-X-press se sometieron a una partición con cloroformo/metanol/agua 3:2:1. La fase inferior se lavó tres veces con fase superior teórica (ver Métodos). Para eliminar los triglicéridos y fosfolípidos existentes en esta fase orgánica, ésta se llevó a seco y saponificó con NaOH 0,2 M por 10 minutos a 37°C.

Los productos así purificados se cromatografiaron por una columna (0,5 x 5 cm) de DEAE-celulosa (forma acetato) (fig. 26). Se eluyó con un gradiente discontinuo de formiato de amonio. En estos cromatogramas se observó una gran cantidad de radioactividad no retenida; sustancias que eluían con la misma concentración salina que Glc-P-Dol de hígado de rata y otras sustancias que eluían a concentraciones salinas más altas.

Se estudió el comportamiento de las sustancias que eluían con formiato de amonio 60 mM por cromatografía en capa delgada (TLC) en distintos solventes. En el solvente (E), se comportaron como derivados de dolicol monofosfato (fig. 27). Con los solventes F y G tenían un valor de  $R_f$  intermedio entre los lípido-azúcares de mamífero y de bacteria, lo que indica un tamaño intermedio de la porción lipídica (fig. 28 y 29). El comportamiento descrito es indistinto para lípido-azúcares extraídos de la forma levadura o micelio. En la fig. 30 se muestra la autorradiografía de una TLC corrida en solvente G en la que se comparan lípido-azúcares de ambas formas. Se ve también la labilidad a hidrólisis ácida suave de estos compuestos, ya que el azúcar liberado pasa a la fase acuosa en una partición cloroformo/metanol/agua 3:2:1. (carriles 8 y 10). Estos azúcares fueron



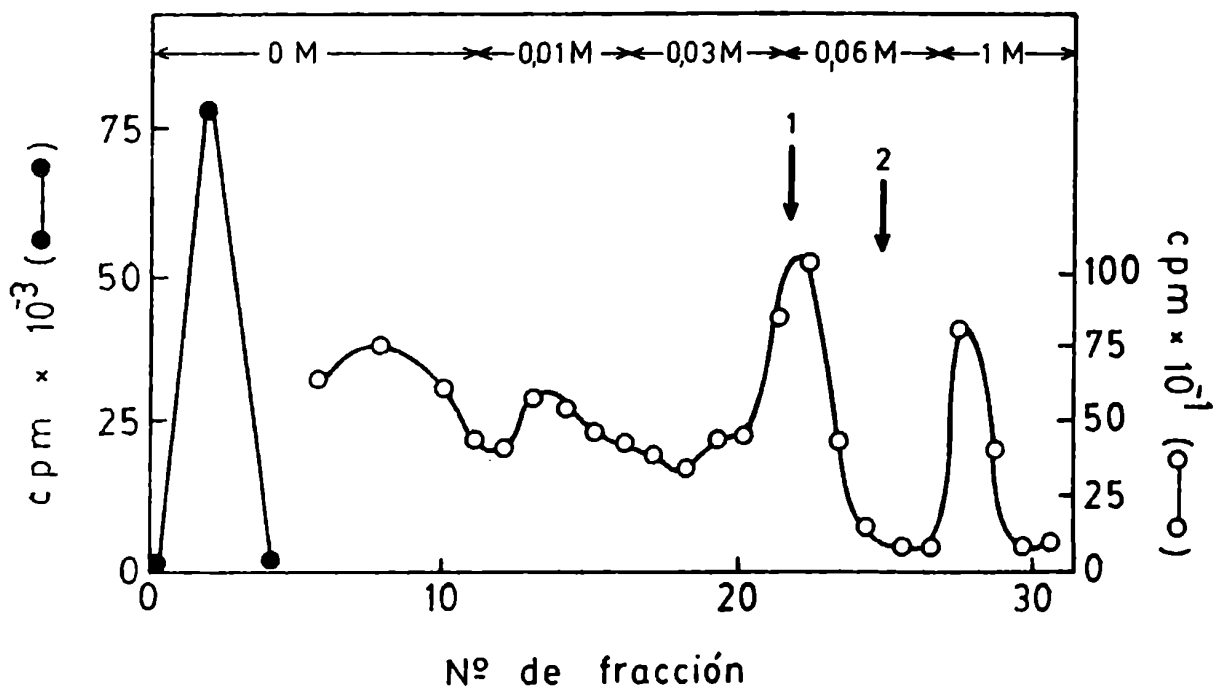


Fig. 26. Cromatografía en DEAE-celulosa de dolicol-P-monosacáridos. Células de la forma levadura de *M.rouxii* incubadas por 5 min. con [U- $^{14}$ C]glucosa fueron rotas y particionadas con cloroformo/metanol/agua 3:2:1. Los productos insaponificables presentes en la fase inferior se cromatografiaron por una columna (0,5 x 5 cm) de DEAE-celulosa (forma acetato), eluyendo con un gradiente discontinuo de formiato de amonio con las molaridades indicadas en la figura. En una columna paralela idéntica se cromatografiaron [ $^3$ H]Glc-P-Dol (1) y [ $^{14}$ C]GlcNAc-P-P-Dol (2) sintetizados a partir de microsomas de hígado de rata y los nucleótido-azúcares correspondientes.

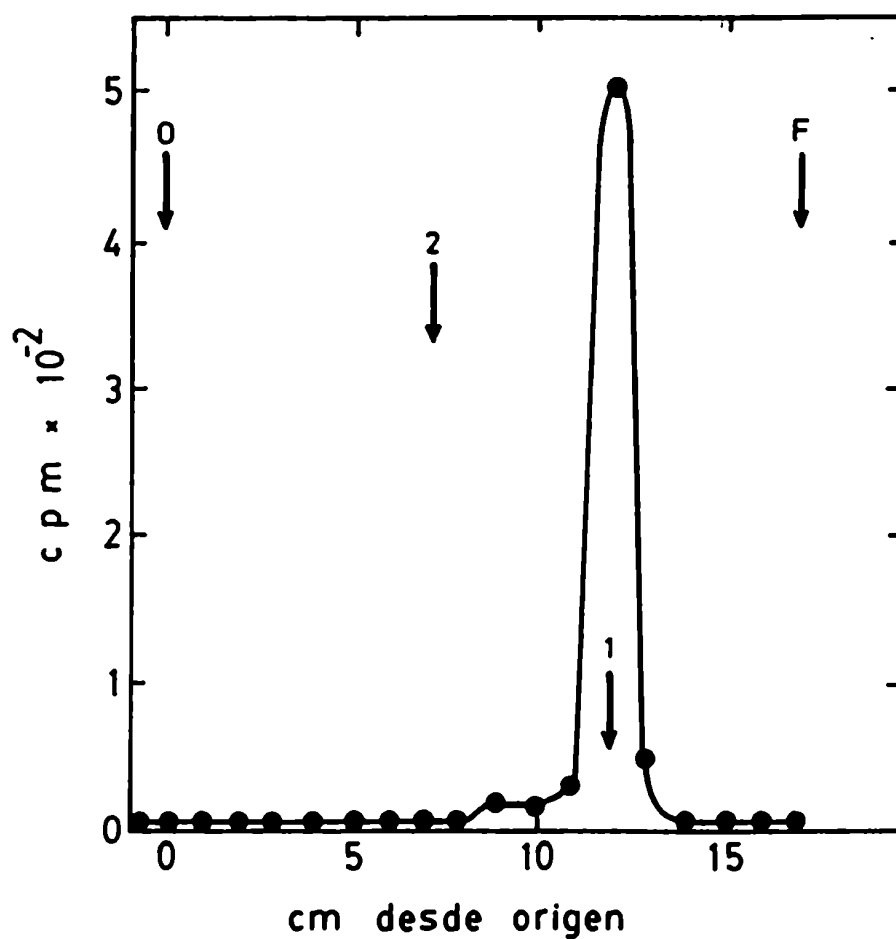


Fig. 27. TLC de dolicol-P-monosacaridos. Los productos eluidos con formiato de amonio 60 mM de la columna de DEAE-celulosa ilustrada en fig. 26 fueron cromatografiados en TLC en solvente E. O= origen, F= frente. Standards: 1. y 2. como en fig. 26.

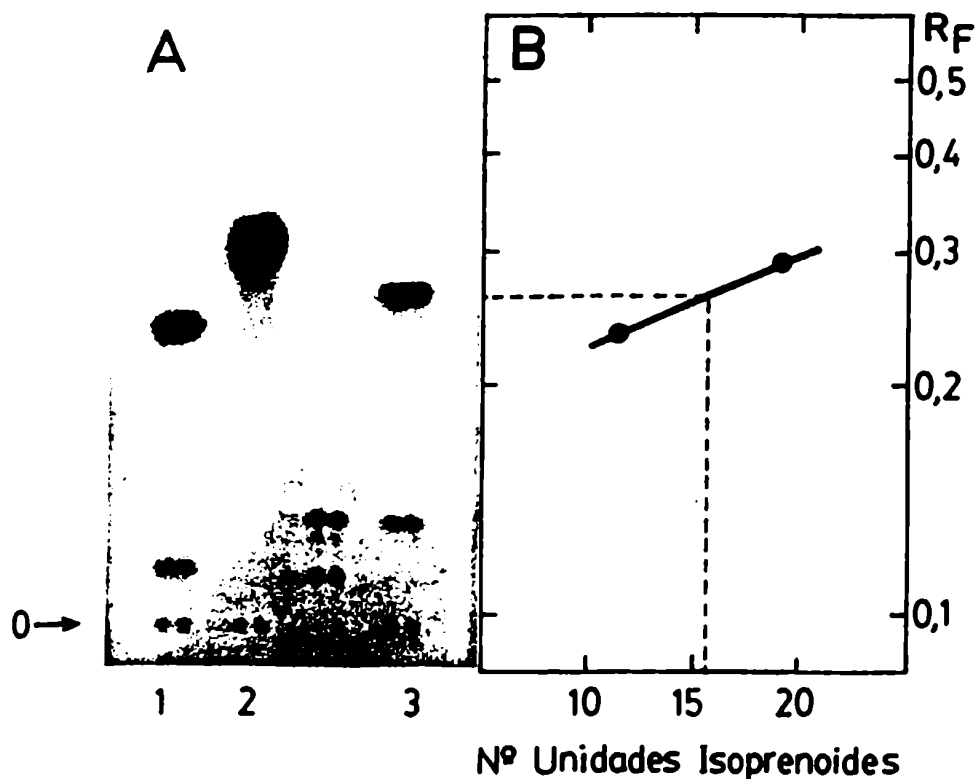


Fig. 28. TLC de dolicol-P-monosacáridos. A. Idem fig. 27 pero en solvente F. Carriles; 1. [ $^{14}$ C]Gal-P-undecaprenol de *A. xylinus*. 2. [ $^{14}$ C]Glc-P-Dol de hígado de rata. 3. [ $^{14}$ C]dolicol-P-monosacáridos de *M. rouxii*. B. El R<sub>f</sub> de cada compuesto en A fue graficado en papel semilogarítmico en función de su No. de unidades isoprenoides.

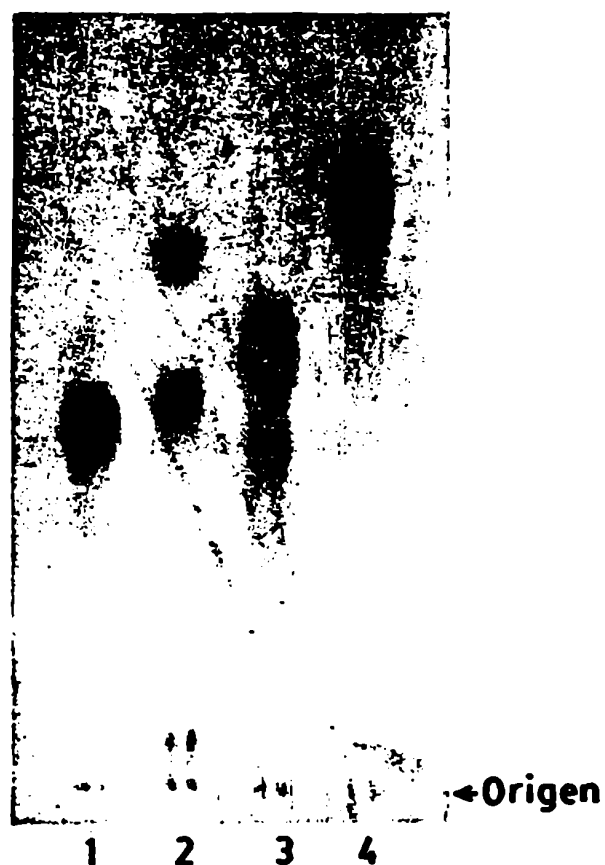


Fig. 29. TLC de dolicol-P-monosacáridos. Idem fig. 27 pero en solvente G. Carriles:

1. [ $^{14}$ C]Gal-P-undecaprenol de *A. xylinus*.
2. [ $^{14}$ C]dolicol-P-monosacáridos de *M. rouxii*.
3. [ $^{14}$ C]Man-P-Dol de hígado de rata.
4. [ $^{14}$ C]Glc-P-Dol de hígado de rata.

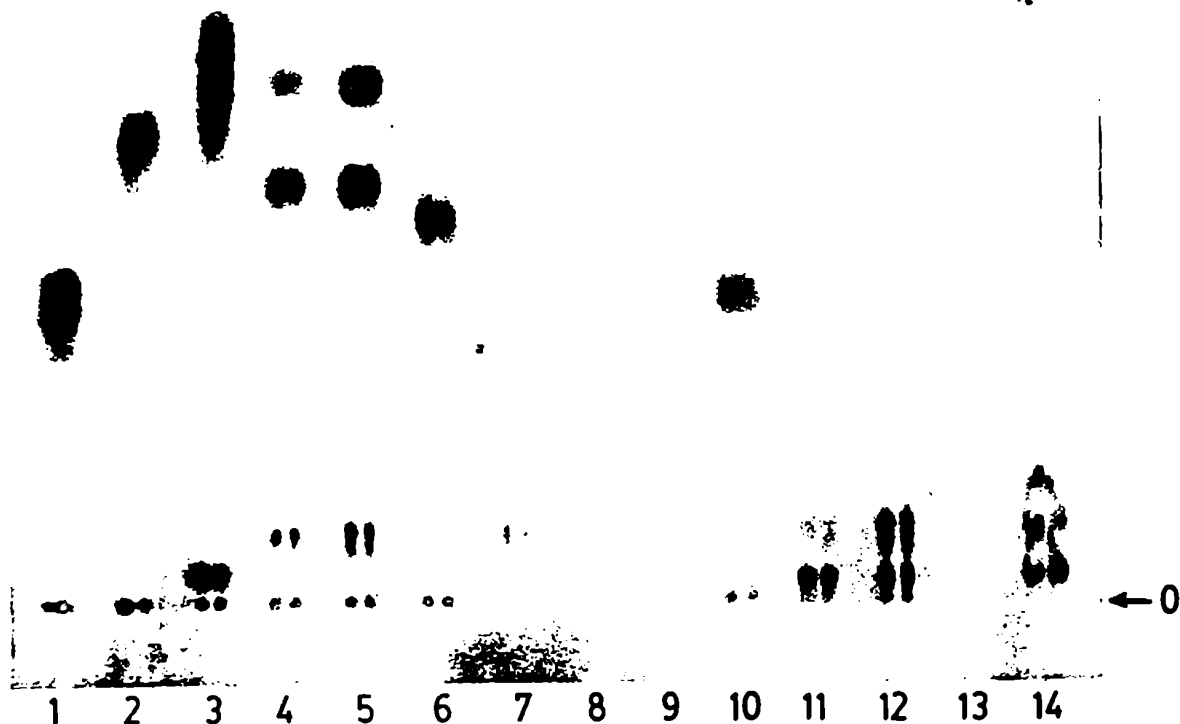


Fig. 30. TLC de sustancias eluidas de la columna de DEAE-celulosa y sus productos de hidrólisis. Idem fig. 29. Solvente 6. En esta cromatografía fueron corridas también otras sustancias eluidas de columnas de DEAE-celulosa similares a la ilustrada en fig. 26. Carriles:

- Standards: 1. [ $^{14}\text{C}$ ]glucosa  
 2. [ $^{14}\text{C}$ ]Man-P-Dol de hígado de rata  
 3. [ $^{14}\text{C}$ ]Glc-P-Dol de hígado de rata  
 6. [ $^{14}\text{C}$ ]Gal-P-undecaprenol de *A. xylinus*.

Sustancias eluidas de DEAE-celulosa con la concentración de formiato de amonio que se indica y provenientes de la forma celular que se indica para cada carril:

- |                     |                    |
|---------------------|--------------------|
| 4. levadura - 60 mM | 11. micelio - 1 M  |
| 5. micelio - 60 mM  | 14. levadura - 1 M |

Otras porciones de las sustancias corridas en los carriles 4, 5 y 11 fueron sometidas a una hidrólisis ácida suave (HCl pH 2 por 15 min. a 100 C) particionando luego con cloroformo/ metanol/ agua 3:2:1. Se cromatografiaron entonces las sustancias presentes en la fase inferior o superior según se indica para cada carril:

- |                               |                               |
|-------------------------------|-------------------------------|
| 7. levadura- 60 mM- fase inf. | 10. micelio- 60 mM- fase sup. |
| 8. levadura- 60 mM- fase sup. | 12. micelio- 1 M- fase inf.   |
| 9. micelio- 60 mM- fase inf.  | 13. micelio- 1 M- fase sup.   |

identificados como glucosa y manosa por cromatografía en papel. La marcación radioactiva era similar en los dos azúcares, tanto en la forma levadura como en la micelar.

Se observa en la fig. 30, carriles 4 y 5 que los lípido-azúcares se separaron en dos compuestos. El de mayor migración, sometido a hidrólisis ácida suave liberó glucosa, mientras que el de menor migración daba manosa. Esta curiosa separación de Glc-P-Dol y Man-P-Dol con el solvente G (fig. 29) podría haber indicado una diferencia en el tamaño de sus porciones lipídicas, pero se encontró que éste no era el caso, como está detallado en la sección siguiente.

Las sustancias que eluían de la columna de DEAE-celulosa con formiato de amonio 1 M (ver fig. 26), no se degradaron por hidrólisis ácida suave como se ve en la figura 30, carriles 12 y 13.

La tabla 3 resume los valores de  $R_f$  para los lípido-azúcares en diferentes solventes.

SUSTANCIA	SOLVENTE		
	E	F	G
Glc-P-Dol de hígado de rata	0,71	0,29	0,52
Man-P-Dol de hígado de rata	-	-	0,43
GlcNAc-P-P-Dol de hígado de rata	0,41	-	-
Glc-P-Dol de <i>M.rouxii</i>	0,71	0,26	0,48
Man-P-Dol de <i>M.rouxii</i>	0,71	0,26	0,39
Gal-P-undecaprenol de <i>A.xylinus</i>	-	0,23	0,35

Tabla 3. Valores de  $R_f$  de lípido-azúcares en cromatografía en capa delgada.

## II. SEPARACION DE DOLICOL MONOFOSFATO MANOSA Y DOLICOL MONOFOSFATO GLUCOSA POR CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA:

La evaluación de la biosíntesis *in vivo* de Man-P-Dol y Glc-P-Dol se realiza incubando las células con glucosa o manosa uniformemente marcadas <sup>14</sup>C. Como no estaba descripto ningún método para separar ambos derivados de dolicol, para discriminar entre ellos se debía someterlos a hidrólisis suave seguida de cromatografía en papel de los monosacáridos resultantes, como describimos para *M.rouxii* en la sección anterior.

Describimos (tabla 3, fig. 29) un solvente en el cual se separan Glc-P-Dol y Man-P-Dol tanto de hígado de rata como de *M.rouxii* por cromatografía en capa delgada. Un solvente similar pero que contenía ácido acético 1N en vez del glacial no separaba los derivados de dolicol <sup>334</sup>.<sup>335</sup>. Después de autorradiografiar las placas se pudieron eluir las sustancias con cloroformo/metanol 2:1. El solvente G también separó Glc-P-Dol de Gal-P-Dol. Este último fue preparado con una enzima de *Acetobacter xylinum* y Dol-P de hígado <sup>327</sup>.

Se pensó que la separación entre Glc-P-Dol y Man-P-Dol pudiera deberse a una posible diferencia en el tamaño de los lípidos de los distintos derivados de dolicol. Esto ocurre con varios solventes (por ej. F, fig. 28), migrando más las moléculas más hidrofóbicas, es decir con dolicol de cadena más larga. Para estudiar esta posibilidad se hicieron los siguientes experimentos:

### II.1. TRATAMIENTO CON PERIODATO DE DERIVADOS DE DOLICOL:

Se trataron Man-P-Dol y Glc-P-Dol de hígado de rata con periodato en presencia de Triton X-100, destruyendo de esta

manera la diferencia entre las porciones hidrofílicas de estos compuestos (fig. 31). Los anillos con acetales dobles resultantes son relativamente estables en medio neutro o ácido <sup>49</sup>.

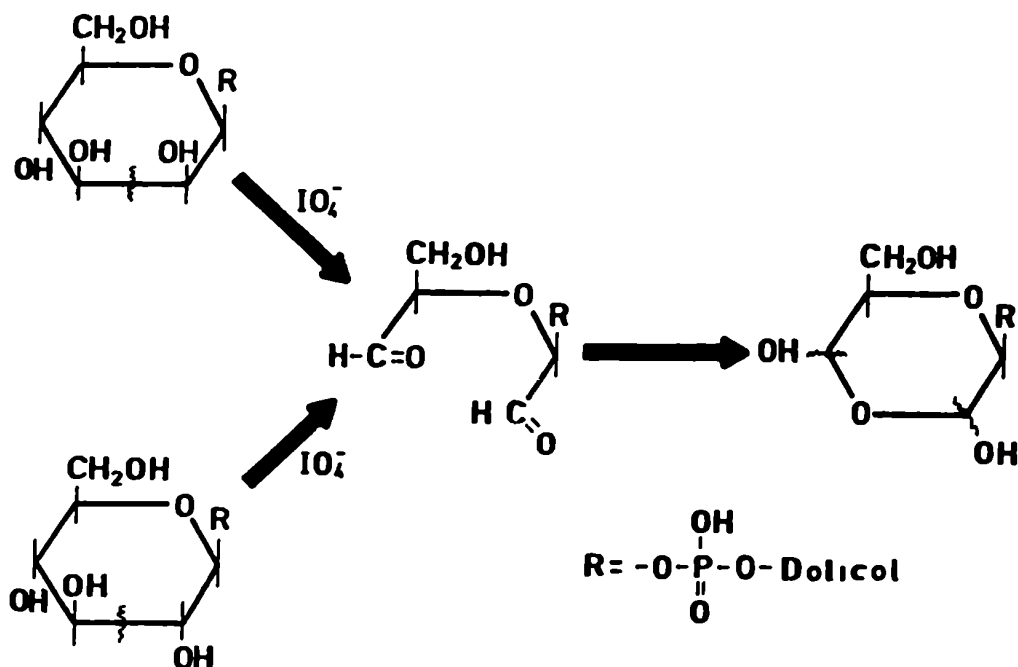


Fig. 31. Tratamiento de Glc-P-Dol y Man-P-Dol con periodato de sodio.

Los derivados de dolicol degradados, tomados de la fase inferior de una partición cloroformo/metanol/agua 3:2:1 se sembraron en una capa delgada y fueron corridos con solvente G. Como se ve en la tabla 4 y fig. 32, Man-P-Dol y Glc-P-Dol de hígado tuvieron la misma migración luego de tratados con periodato. Lo mismo ocurrió con Man-P-Dol y Glc-P-Dol de *M.rouxii*. En cambio, Glc-P-Dol y Gal-P-undecaprenol tratados con periodato migraron en forma diferente, indicando distintos tamaños de las





Fig. 32. Tratamiento de dolicol-P-monosacáridos con periodato de sodio. Se trataron dolicol-P-monosacáridos de hígado de rata con periodato de sodio 0,1 M durante 48 hs. en presencia de 0,1% de Triton X-100, luego de lo cual se partitionaron con cloroformo/ metanol/ agua 3:2:1. Los productos presentes en la fase inferior fueron cromatografiados en TLC en solvente G. Como control se incubaron los lípido-azúcares en las mismas condiciones pero sin periodato. Carriles: 1. [ $^{14}$ C]Glc-P-Dol tratado con periodato. 2. [ $^{14}$ C]Glc-P-Dol + [ $^{14}$ C]Man-P-Dol sin tratar. 3. [ $^{14}$ C]Man-P-Dol tratado con periodato.

porciones lipídicas (tabla 4).

Por lo tanto, la separación de Man-P-Dol y Glc-P-Dol se debió a la parte de azúcar y no a la porción lipídica de las moléculas.

EXPERIMENTO No.	SUSTANCIA	Rf
1	Glc-P-Dol de hígado de rata	0,48
	Man-P-Dol de hígado de rata	0,38
	<i>Tratados con periodato:</i>	
	Glc-P-Dol de hígado de rata	0,72
2	Man-P-Dol de hígado de rata	0,72
	Glc-P-Dol de hígado de rata	0,54
	Gal-P-undecaprenol de <i>A.xylinus</i>	0,32
	<i>Tratados con periodato:</i>	
3	Glc-P-Dol de hígado de rata	0,76
	Gal-P-undecaprenol de <i>A.xylinus</i>	0,69
	<i>Tratados con periodato:</i>	
	Glc-P-Dol de hígado de rata	0,66
	Glc-P-Dol de <i>M.rouxii</i>	0,63
	Man-P-Dol de <i>M.rouxii</i>	0,63

Tabla 4. Valores de *Rf* en TLC de lípido-azúcares tratados o no con periodato de sodio. Se cromatografió en capa delgada de silicagel con solvente G. Los experimentos 1, 2 y 3 corresponden a distintas corridas, en cada una de las cuales se sembraron las diferentes sustancias en una misma placa.

## II.2. FILTRACION POR GEL DE LOS DERIVADOS DE DOLICOL-P:

El desoxicolato de sodio forma complejos de inclusión con ácidos grasos y poliprenoles y el número de moléculas de desoxicolato incluídas depende del largo de la cadena del lípido <sup>102</sup>.

Se sometieron [ $^3\text{H}$ ]Glc-P-Dol y [ $^{14}\text{C}$ ]Man-P-Dol de hígado de rata a filtración por gel en Sephadex 6-75 en presencia de 0,5% de desoxicolato de sodio. Como se ve en la fig. 33 A no se separaron. [ $^{14}\text{C}$ ]Man-P-Dol y [ $^{14}\text{C}$ ]Glc-P-Dol de *N.rouxii* se cromatografiaron y eluyeron como un pico único (fig. 33 C). En la fig. 33 B se ve que Glc-P-Dol de hígado y Gal-P-undecaprenol de *A.xylinus* sí se separaron en una cromatografía similar.

Se demostró así que Man-P-Dol y Glc-P-Dol tienen un poliprenol del mismo tamaño cuando son sintetizados por la misma célula  $^2$ .

### III. TAMAÑO DE LA PORCIÓN LIPÍDICA:

Comparando los volúmenes de elución en Sephadex de Glc-P-Dol de hígado de rata con Glc-P-Dol y Man-P-Dol de *N.rouxii* o Gal-P-undecaprenol de *Acetobacter xylinus* (fig. 33 B y C) se pudo calcular el largo del dolicol del hongo. Graficando el logaritmo del N° de unidades isoprenoides en función de los volúmenes de elución (fig. 33 D) se obtuvo para Glc-P-Dol y Man-P-Dol de *N.rouxii* un largo promedio de 15,5 unidades isoprenoides.

Al graficar el logaritmo de los valores de Rf en TLC en solvente F en función del N°. de unidades isoprenoides del lípido estudiado se pudo establecer un valor aproximado del tamaño del dolicol de *Mucor rouxii*. Este resulto ser de 15,5 unidades isoprenoides, (fig. 28 B), coincidente con el calculado a partir de los valores de filtración por gel.

Estos resultados son válidos tanto para la forma levadura como la micelar del hongo, ya que no se aprecian diferencias entre ambas formas en cuanto al tamaño de la parte lipídica de los dolicol-P-monosacáridos.

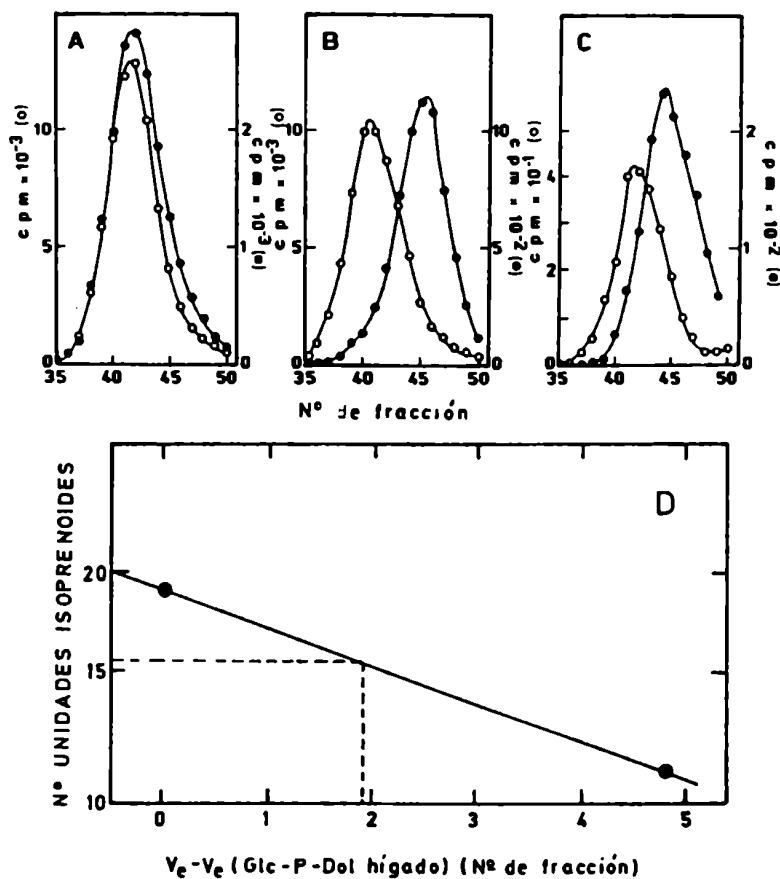


Fig. 33. Filtración por Sephadex G75 de lípido-P-monosacáridos. A.  $[^3\text{H}]\text{Glc-P-Dol}$  (o) y  $[^{14}\text{C}]\text{Man-P-Dol}$  (●) de hígado de rata. B.  $[^3\text{H}]\text{Glc-P-Dol}$  de hígado de rata (o) y  $[^{14}\text{C}]\text{Gal-P-undecaprenol}$  de *Acetobacter xylinum* (●). C.  $[^3\text{H}]\text{Glc-P-Dol}$  de hígado de rata (o) y una mezcla de  $[^{14}\text{C}]\text{Glc-P-Dol}$  y  $[^{14}\text{C}]\text{Man-P-Dol}$  de *Mucor rouxii* (●). D. Los volúmenes de elución de los compuestos de B y C se graficaron en papel semi-logarítmico en función de su número de unidades isoprenoides.

#### IV. CARACTERIZACION DE DOLICOL-P-P-OLIGOSACARIDOS:

El estudio de los dolicol-P-P-oligosacáridos también se realizó con material obtenido por incubación de células de las formas levadura y micelio con [U-<sup>14</sup>C]glucosa por tiempos breves.

La interfase proteica de la partición mencionada en la caracterización de los dolicol-P-monosacáridos fue extraída con cloroformo/metanol/agua 10:10:3, solvente comunmente utilizado para dolicol-P-P-oligosacáridos <sup>146</sup>. El extracto fue cromatografiado en una columna (0,5 x 5 cm) de DEAE-celulosa (forma acetato). Según se ve en la fig. 34 se retuvo radioactividad que eluyó con la misma concentración de formiato de amonio que un derivado de dolicol-P-P de hígado de rata.

El compuesto eluido con formiato de amonio 10 mM fue tratado con fenol 50% a 70°C a diferentes tiempos. Las uniones fosfato alílicas son lábiles en estas condiciones, mientras que las no alílicas son resistentes incluso luego de 90 minutos de tratamiento <sup>326</sup>. Debido al carácter anfipático de los dolicol-P-P-oligosacáridos, existe una distribución entre la fase acuosa y la fenólica, pero se puede medir la resistencia observando la variación de la distribución entre las fases con el tiempo de tratamiento (el oligosacárido libre es totalmente soluble en agua). El compuesto de *M.rouxii* resultó ser resistente, comportándose como el intermediario de mamífero (fig. 35). Esto indicó que la unidad  $\alpha$ -isoprenoide estaba saturada como en los dolicoles, no siendo así en el undecaprenol bacteriano<sup>324</sup>.

Por filtración en gel Sephadex G-75 en presencia de desoxicolato de sodio 0,5% el compuesto eluyó después que el dolicol-P-P-oligosacárido intermediario de hígado de rata, indicando un tamaño menor. Como veremos en la sección C.IV.1, el tamaño del oligosacárido es el mismo y por lo tanto debe ser más pequeña la

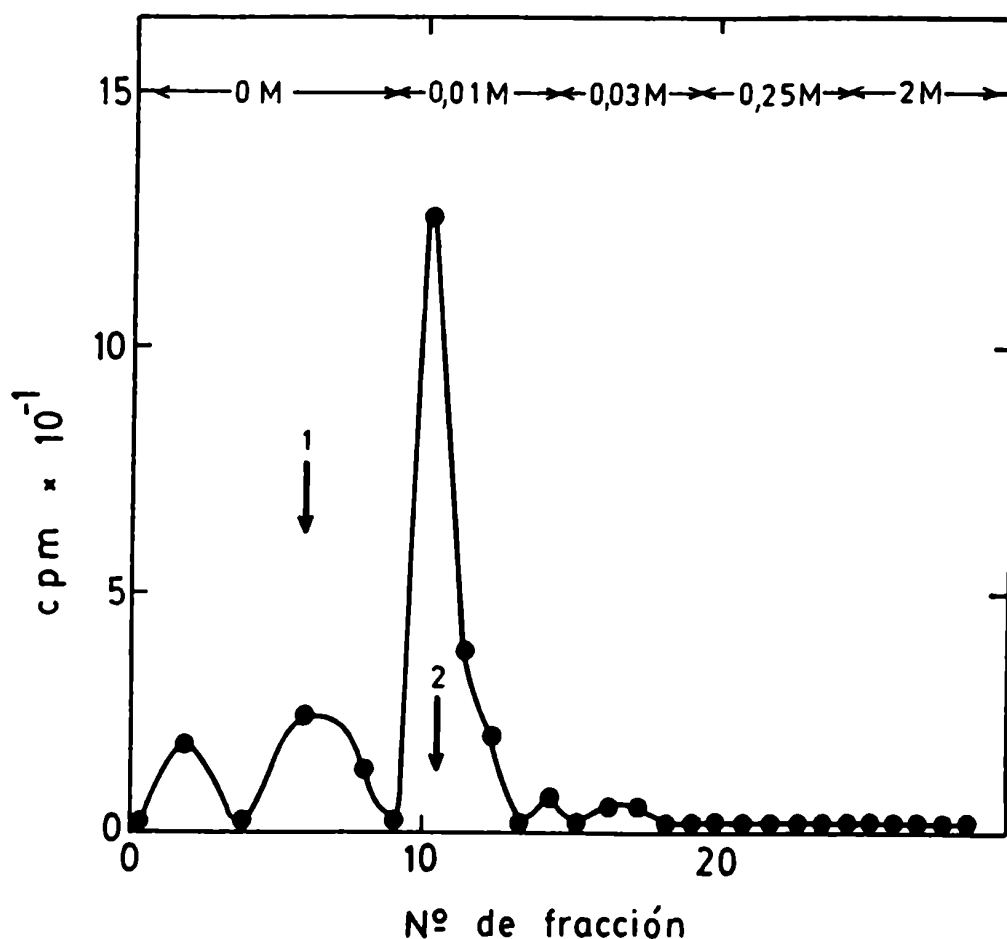


Fig. 34. Cromatografía en DEAE-celulosa de dolicol-P-P-oligosacaridos. Células de la forma levadura de *M.rouxii* incubadas por 5 minutos con [U-<sup>14</sup>C]glucosa fueron rotas y particionadas con cloroformo/ metanol/ agua 3:2:1. La interfase se extrajo con cloroformo/ metanol/ agua 10:10:3. Las sustancias presentes en el extracto se cromatografiaron por una columna (0.5 x 5 cm) de DEAE-celulosa (forma acetato), eluyendo con un gradiente discontinuo de formiato de amonio en el mismo solvente, con las molaridades indicadas en la figura. En una columna paralela idéntica se cromatografiaron [<sup>3</sup>H]Glc-P-Dol (1) y [<sup>14</sup>C]Glc<sub>1</sub>- $\alpha$ -Man $\gamma$ GlcNAc<sub>2</sub>-P-P-Dol (2) sintetizados a partir de microsomas de hígado de rata y UDP-[<sup>3</sup>H]Glc o UDP-[<sup>14</sup>C]Glc.

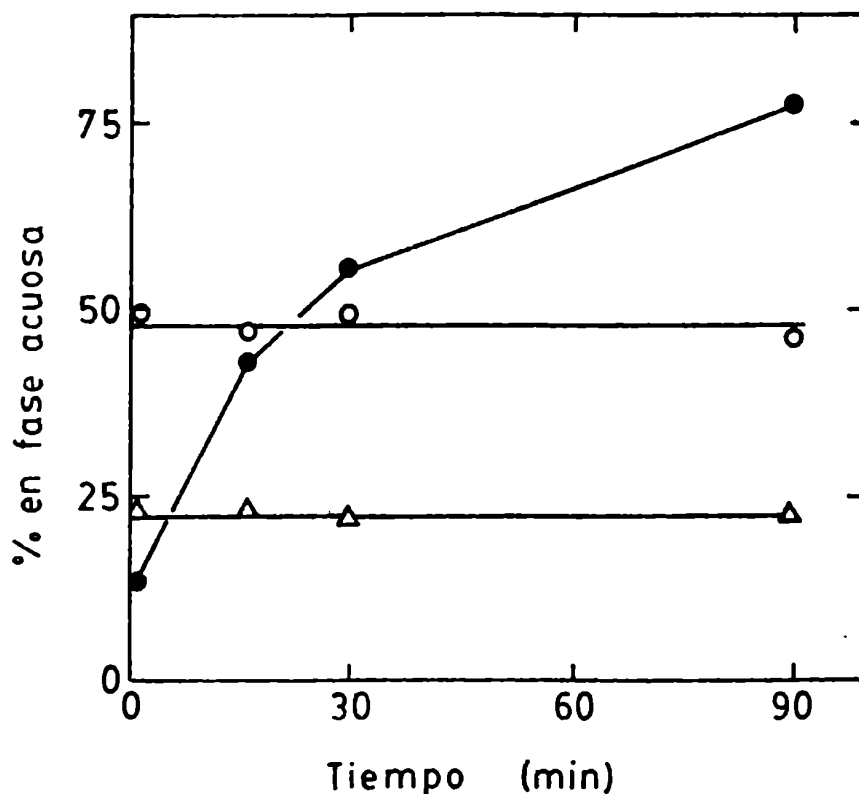


Fig. 35. Degradación con fenol de dolicol-P-P-oligosacáridos. Las sustancias eluidas de la columna de DEAE-celulosa con formiato de amonio 10 mM (fig. 34) fueron tratadas con fenol 50 % a 70 C por distintos tiempos (●). Paralelamente se trataron Glc<sub>1</sub>- $\rightarrow$ Man $\rightarrow$ GlcNAc<sub>2</sub>-P-P-Dol de hígado de rata (○) y Gal-P-undecaprenol de *A. xylinum* (△). Se interrumpieron las reacciones a los tiempos indicados en la figura agregando 1 volumen de agua y contando las fases acuosa y fenólica. Se calculó el porcentaje de la radioactividad total presente en la fase acuosa.

porción lipídica del compuesto de *M.rouxii*, igual que en el caso de los dolicol-P-monosacáridos.

#### IV.1. PORCION SACARIDICA DEL DOLICOL-P-P-OLIGOSACARIDO:

Se sometió al derivado de Dol-P-P de la forma levadura a hidrólisis ácida suave. Por cromatografía en papel, se obtuvo un solo pico con igual migración que un standard de  $\text{Glc} \rightarrow \text{Man} \rightarrow \text{GlcNAc}_2$ , tanto para la forma levadura como para la forma micelar (fig. 36). El oligosacárido liberado se sometió a hidrólisis ácida total, y se obtuvo manosa y glucosa en la relación 2:1 (fig. 37); (las glucosas, externas, son marcadas primero y por lo tanto con mayor actividad específica que las manosas). Las N-acetilglucosaminas (en el extremo reductor) necesitan pulsos muy largos para ser marcadas. Por lo tanto, para establecer su existencia se sometió el oligosacárido a una desacetilación parcial a distintos tiempos: por tratamiento con hidróxido de potasio 2 N a tiempos crecientes (previa reducción con  $\text{NaBH}_4$ ), se desacetilan progresivamente las N-acetilglucosaminas presentes, obteniéndose en una electroforesis en medio ácido tantos picos como unidades del amino-azúcar, más un pico neutro del oligosacárido acetilado original. Para el oligosacárido del derivado de dolicol-P-P de *M.rouxii* se obtuvo el esquema mostrado en la fig. 38. El compuesto original neutro (fig. 38 A) se desacetiló para dar dos picos cargados (fig. 38 B) y por tratamiento alcalino más prolongado se completó la desacetilación, aumentando la proporción del pico con doble carga (fig. 38 C). Este resultado (fig. 38 D) indicó la presencia de dos N-acetilglucosaminas.

#### IV.2. ESTRUCTURA DEL OLIGOSACARIDO:

Para mejor comprensión del estudio estructural se recomienda remitirse a la fig. 13, donde se muestra la estructura del



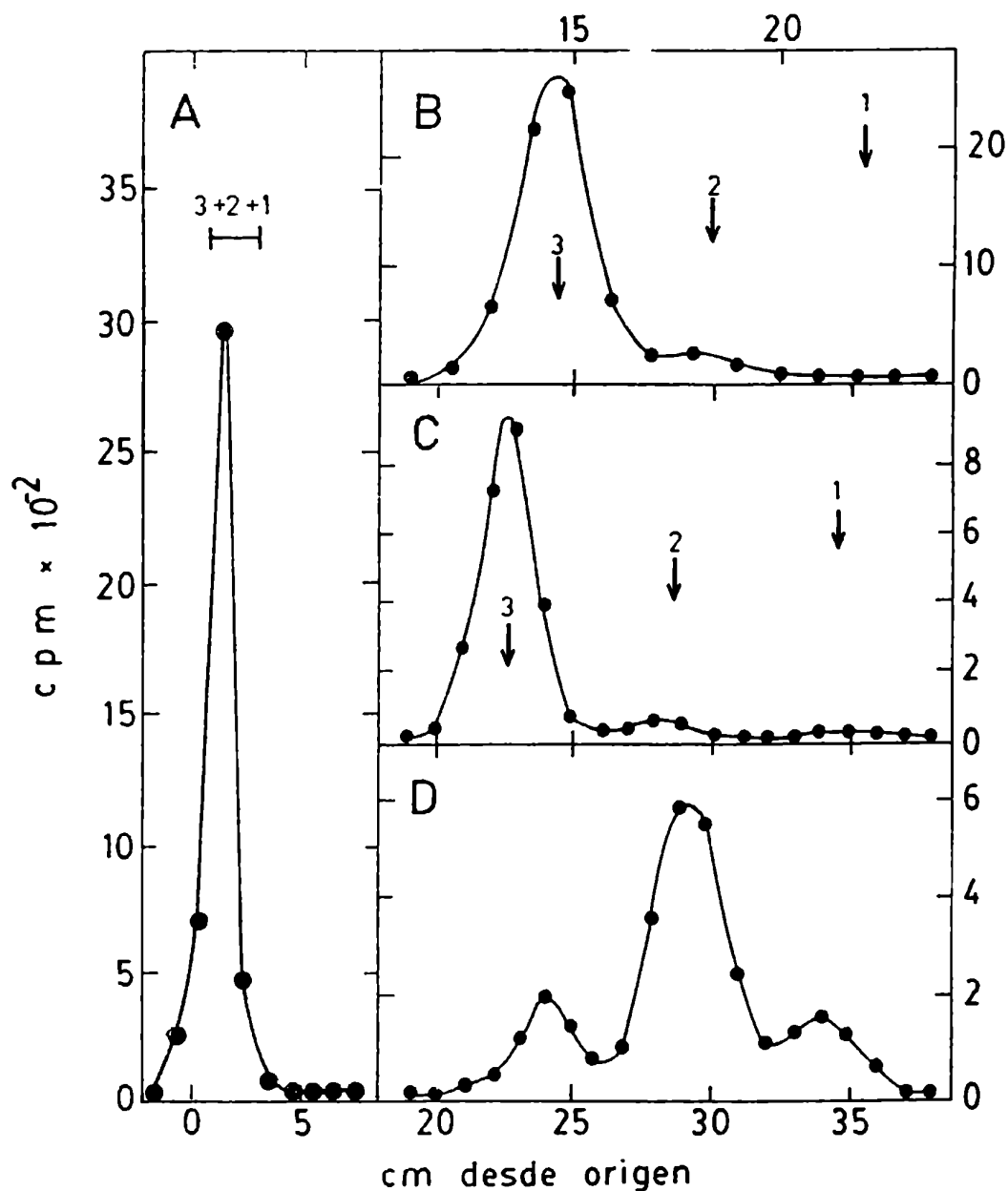


Fig. 36. Productos de hidrólisis ácida suave de dolicol-P-P-oligosacáridos. Los productos liberados por hidrólisis ácida suave (HCl pH 2 por 15 min. a 100°C) de dolicol-P-P-oligosacáridos de *M. rouxii*, provenientes de la forma levadura (A y C) o micelar (B) incubadas con [U-<sup>14</sup>C]glucosa, o sintetizados *in vitro* a partir de UDP-[<sup>3</sup>H]Glc, y microsomas de hígado de rata (D), fueron cromatografiados en solvente B (A) o en solvente A (B, C y D).

Standards: 1. Glc<sub>1</sub>Man<sub>2</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, 2. Glc<sub>2</sub>Man<sub>2</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, 3. Glc<sub>3</sub>Man<sub>2</sub>GlcNAc<sub>2</sub>.

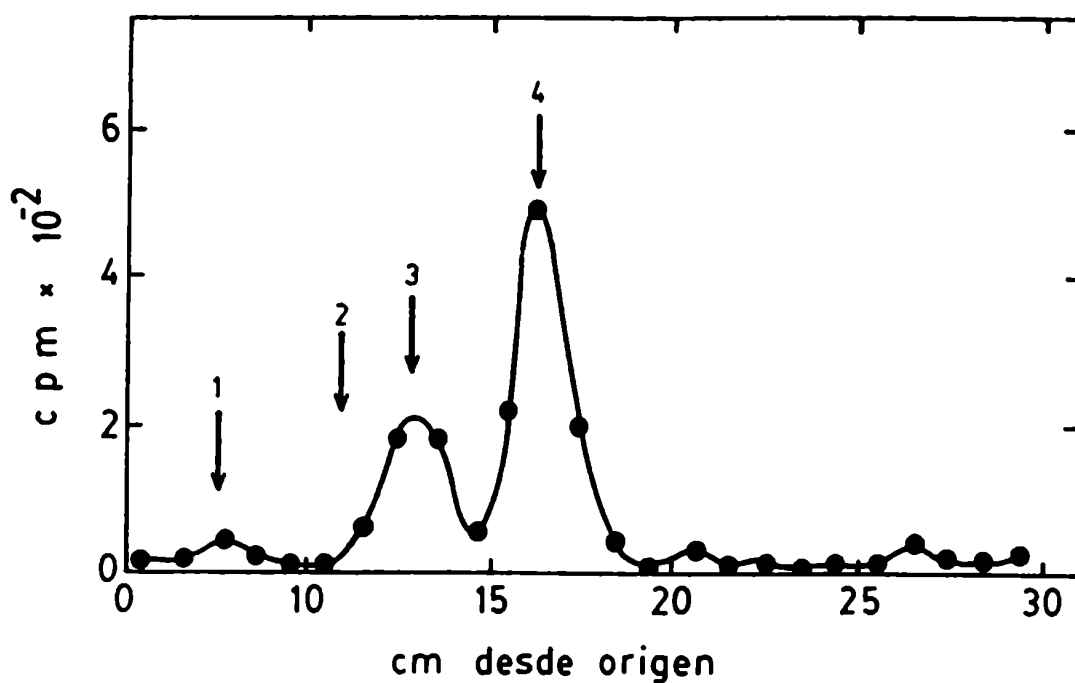


Fig. 37. Hidrólisis ácida total. El oligosacárido derivado de dolicol-P-P de la forma levadura de *M.rouxii* (fig. 36 B) fue sometido a hidrólisis ácida total (HCl 1 N a 100 °C por 4 hs.) y los productos fueron cromatografiados en papel en solvente C. Standards: 1. GlcNH<sub>2</sub>, 2. Gal, 3. Glc, 4. Man.

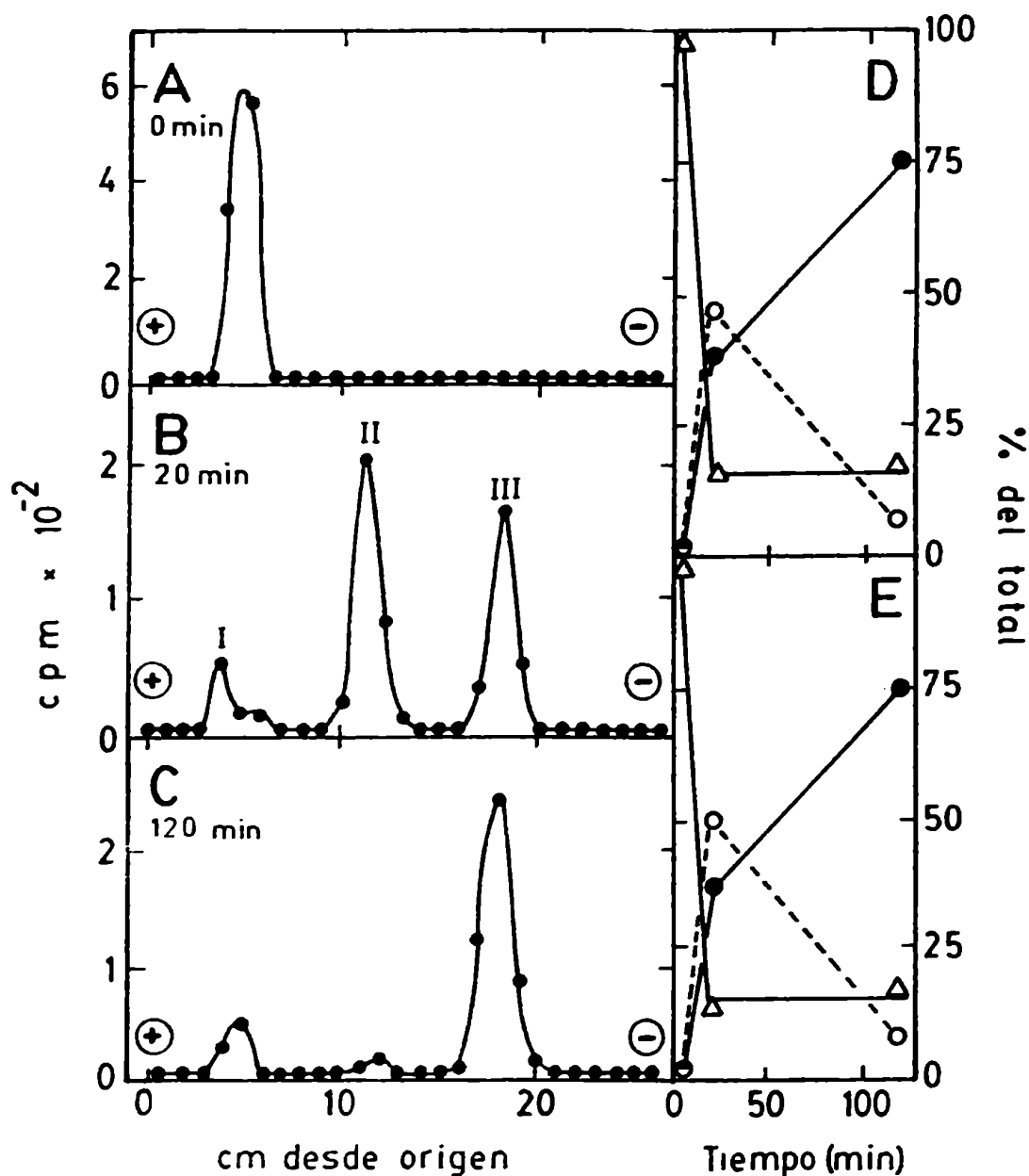


Fig. 38. Desacetilación parcial a distintos tiempos. El oligosacárido derivado de dolicol-P-P (fig. 36) fue reducido con  $\text{NaBH}_4$ , luego tratado con  $\text{KOH}$  2 N a  $100^\circ\text{C}$  por los tiempos indicados y luego sometido a electroforesis en papel en fórmico 5 % (A, B, C). En D se grafica el porcentaje que sobre el total representa cada uno de los tres picos a los distintos tiempos. I ( $\Delta-\Delta$ ), II ( $o-o$ ), III ( $\bullet-\bullet$ ). El mismo experimento fue realizado con  $[\text{glucosa}-^3\text{H}]\text{Glc}\rightarrow\text{Man}\rightarrow\text{GlcNAc}_2$  de hígado de rata (E).

intermediario de mamífero, habiendo resultado la estructura del oligosacárido del intermediario de *M.rouxii* igual a la de aquél.

#### IV.2.a) Extremo reductor:

El oligosacárido fue tratado con Endo H, luego reducido con  $\text{NaBH}_4$ , y entonces desacetilado con hidróxido de potasio 2 N (por 60 min.), y el producto se sometió a electroforesis en papel en ácido fórmico 5% (fig. 39). El resultado indica que luego del tratamiento con Endo H se perdió una N-acetil glucosamina, y por lo tanto también el pico con doble carga. Esto demuestra la presencia de dos N-acetilglucosaminas unidas por unión  $\beta(1\rightarrow4)$  (N,N' di-acetil quitobiosa) en el extremo reductor del oligosacárido, y un tronco mínimo de manosas como se indicó en la sección A.I.10.b.

#### IV.2.b) Tratamiento con $\alpha$ -manosidasa:

Por degradación exhaustiva con  $\alpha$ -manosidasa se obtuvo manosa y dos oligosacáridos que migraron como los productos del tratamiento de un standard de  $\text{Glc}\rightarrow\text{Man}\rightarrow\text{GlcNAc}_2$  de mamífero (fig. 40). Los productos resistentes a  $\alpha$ -manosidasa serían entonces  $\text{Glc}\rightarrow\text{Man}\rightarrow\text{GlcNAc}_2$  y  $\text{Glc}\rightarrow\text{Man}\rightarrow\text{GlcNAc}_2$ . Este último conserva la manosa con unión  $\alpha(1\rightarrow6)$  a la  $\beta$ -manosa (ver fig. 13), cuya hidrólisis enzimática se ve dificultada por la presencia de las glucosas<sup>177</sup>.

#### IV.2.c) Uniones:

Luego de una degradación por acetólisis (que rompe en forma muy preferencial las uniones  $1\rightarrow6$ ) se obtuvo manobiosa, mano-

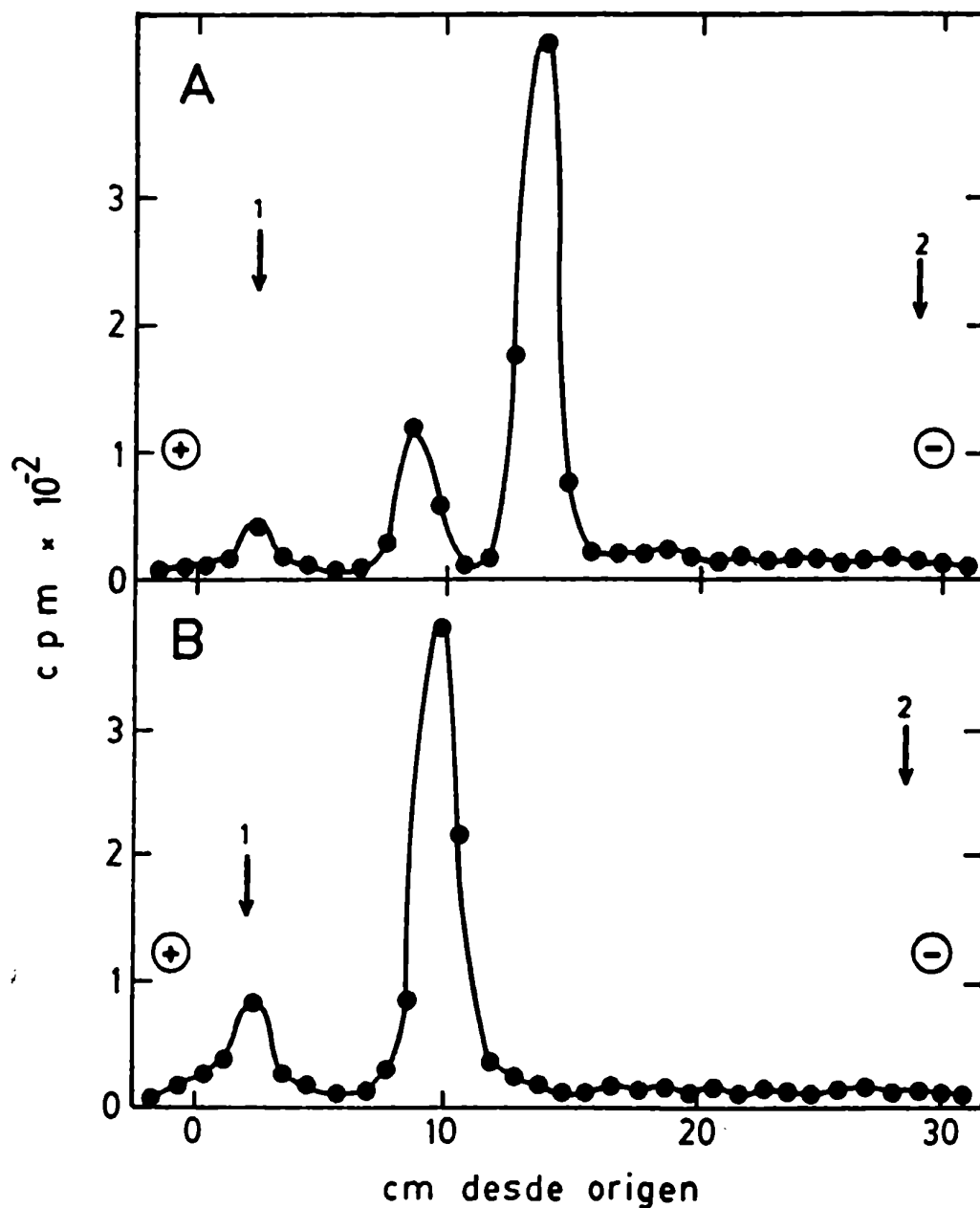


Fig. 39. Tratamiento con Endo H del oligosacárido derivado de dolicol-P-P. El oligosacárido derivado de dolicol-P-P (fig. 36 B) fue tratado con Endo H, luego reducido con NaBH<sub>4</sub> y a continuación desacetilado por 60 min. y sometido a electroforesis en papel en ácido fórmico 5 %. A. Sin tratar. B. Tratado. Standards: 1. Glc, 2. GlcNH<sub>2</sub>.

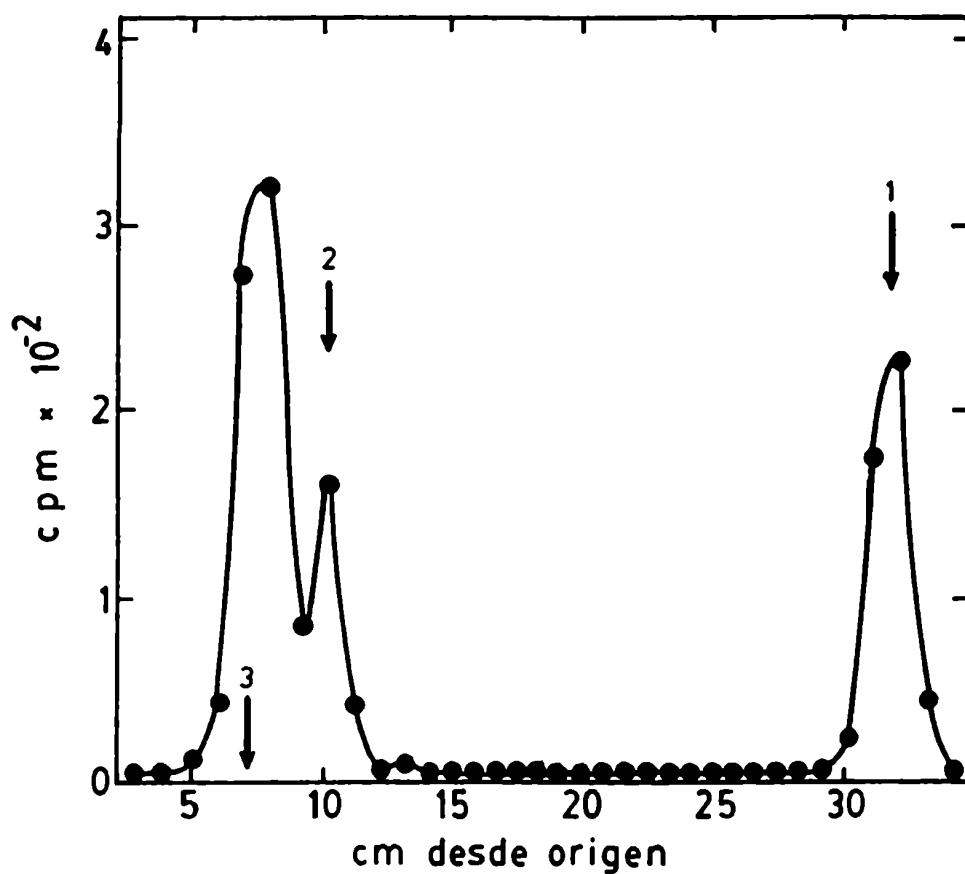


Fig. 40. Degradación con  $\alpha$ -manosidasa. El oligosacárido proveniente del derivado de dolicol-P-P (fig. 36) fue tratado con  $\alpha$ -manosidasa. Los productos se cromatografiaron en papel en solvente B. *Standards*: 1. Man, 2. Glc $\rightarrow$ Man $\rightarrow$ GlcNAc<sub>2</sub>, 3. Glc $\rightarrow$ Man $\rightarrow$ GlcNAc<sub>2</sub>.

triosa y un oligosacárido que migraba como  $\text{Glc}\rightarrow\text{Man}\rightarrow\text{GlcNAc}_2$  de mamífero (fig. 41 A). El mismo resultado se obtuvo con el standard  $\text{Glc}\rightarrow\text{Man}\rightarrow\text{GlcNAc}_2$  de mamífero.

Los alditos sustituidos en la posición 3 no migran en electroforesis en papel en buffer de molibdato de sodio, pH 5,0; sí lo hacen los sustituidos en otras posiciones<sup>334</sup>. Esto es válido aun cuando los sustituyentes sean mono o disacáridos<sup>144</sup>. La manobiosa y manotriosa provenientes de la acetólisis se redujeron con borohidruro de sodio y sometieron a electroforesis en papel.

El trisacárido no migró indicando unión 1-3 al extremo reductor (fig. 41 C). El disacárido en cambio migró a la misma posición que  $\text{Man}\times(1\rightarrow2)\text{Manol}$  standard (fig. 41 D).

Por análisis de metilación del trisacárido reducido el extremo reductor daría como producto un alditol pentametilado. Este se va con el frente en el sistema cromatográfico empleado. La obtención de 3,4,6 tri-O-metilmanosa indica, por lo tanto, una unión 1 $\rightarrow$ 2 del extremo no reductor (fig. 41 B). Por análisis de metilación del oligosacárido original se obtuvieron diversos derivados metilados que no se separaron adecuadamente en el sistema de TLC empleado. Sin embargo, sí se pudo determinar la existencia de un solo tipo de derivado dimetilado de manosa diferente de 3,4 di-O-metilmanosa.

La estructura que se puede concluir de los resultados anteriores y teniendo en cuenta la especificidad de la Endo H, está ilustrada en la figura 42.

La estructura de este compuesto es igual en las formas levadura y micelio y coincide con el intermediario de mamíferos y *S.cerevisiae* (fig. 13) <sup>72,174</sup>.

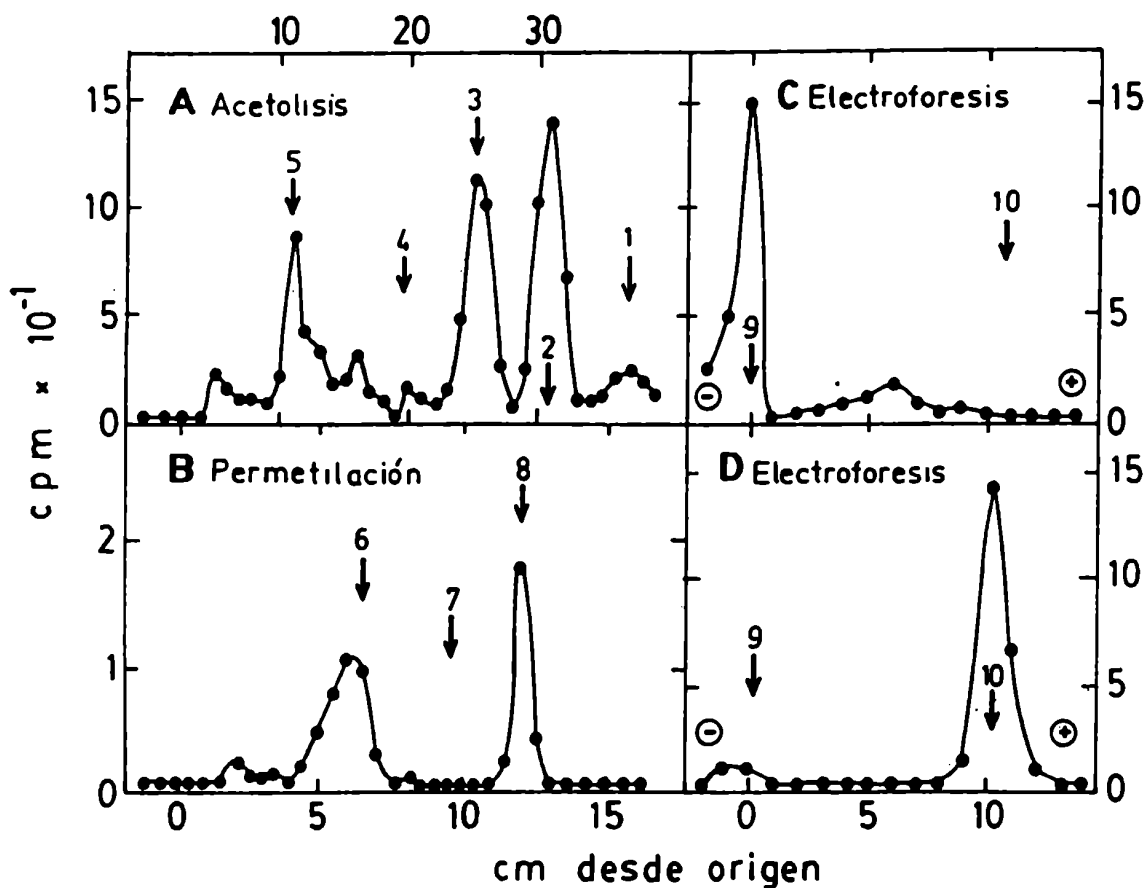


Fig. 41. Estudio estructural del oligosacárido proveniente del derivado de dolicol-P-P.

A. Acetólisis. El oligosacárido separado del derivado de dolicol-P-P (fig. 36) fue sometido a una degradación por acetólisis y los productos cromatografiados en papel en solvente B.

B. Permetilación. El producto de acetólisis que migró como manotriosa fue eluido, y una parte reducida con NaBH<sub>4</sub>, permetilada e hidrolisada. Los productos fueron cromatografiados en papel en solvente H.

C y D. Electroforesis en molibdato. Los productos de acetólisis que migraron como manotriosa (C) y manobiosa (D), fueron eluidos, reducidos con NaBH<sub>4</sub> y sometidos a electroforesis en molibdato de sodio. (solvente L)

Standards: 1. Man, 2. manobiosa, 3. manotriosa, 4. manotetraosa, 5. Glc $\alpha$ Man $\alpha$ GlcNAc, 6. 3,4,6 tri-O-MeMan, 7. 2,4,6 tri-O-MeMan, 8. 2,3,4,6 tetra-O-MeMan, 9. Man  $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 2)Man  $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 3)Manol, 10. Man  $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 2)Manol.



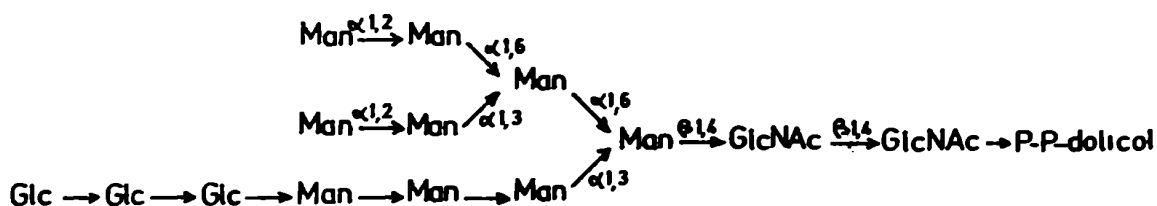


Fig. 42. Estructura del dolicol-P-P-oligosacárido intermedio de *Nucor rouxii* (formas levadura y micelio).

#### V. AISLAMIENTO DE OLIGOSACARIDOS DE GLICOPROTEINAS:

Se incubaron células de las formas levadura o micelio con [U-<sup>14</sup>C]glucosa por 5, 20, 40 o 180 minutos y se rompieron con una Biox-X-press. Los precipitados proteicos remanentes de la extracción con cloroformo/metanol/agua 10:10:3 (ver sección B.III.5) se trataron exhaustivamente con una proteasa. Los glicopéptidos así obtenidos se purificaron por filtración a través de una columna (1,25 x 120 cm) de Biogel P6 y por electroforesis en papel en ácido fórmico 5% (fig. 43 A,B).

Los oligosacáridos unidos N-glicosídicamente se liberaron de los glicopéptidos por tratamiento con Endo H; sometiendo los productos a electroforesis en ácido fórmico 5% se ve que han perdido la carga (fig. 43 C). Esto se debe a que por acción de la Endo H se escinde un residuo de N-acetilglucosamina, perdiéndose con ésta el aminoácido del glicopéptido. El oligosacárido resultante es neutro.

Por cromatografía en papel de los oligosacáridos se obtuvo una serie de compuestos que migraron como standards de 6 ó más unidades de azúcar (fig. 44 A-D y 45 A-D). Se encontraron

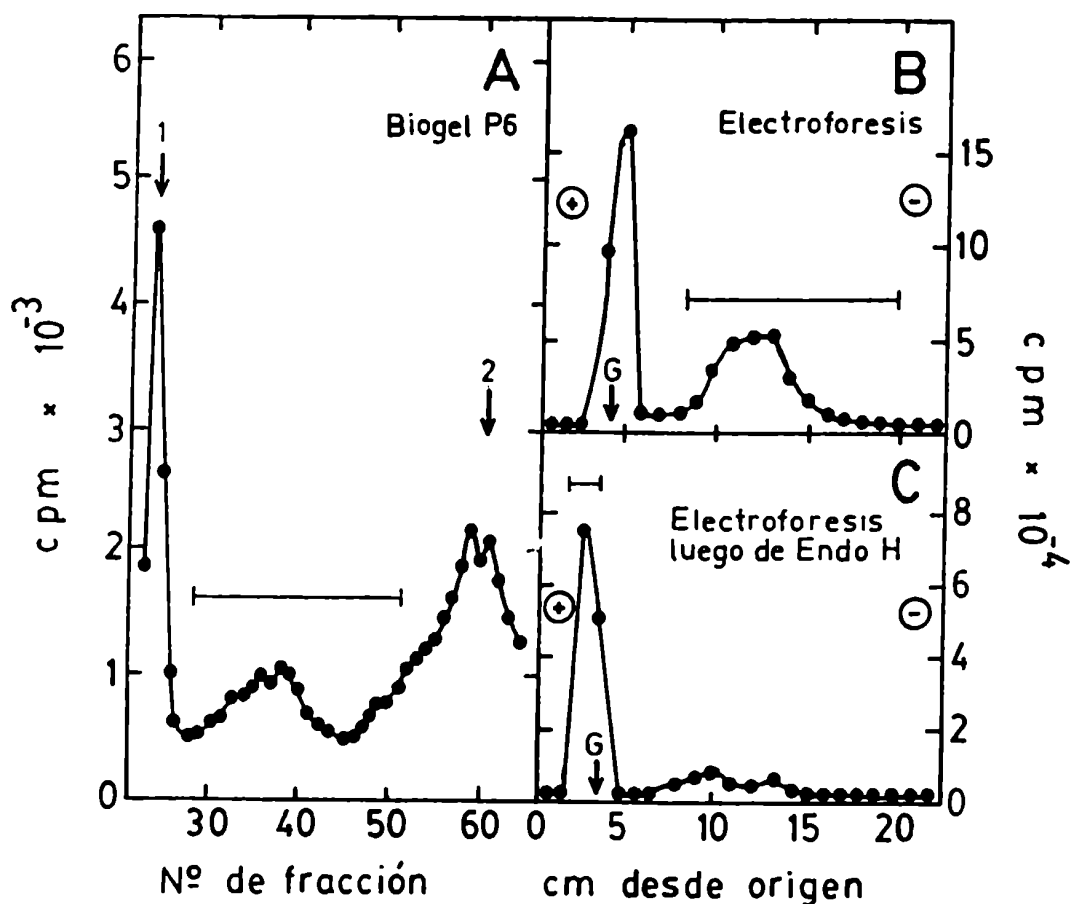


Fig. 43. Purificación de glicopéptidos. Separación de oligosacáridos con unión N-glicosídica.

A. Biogel P6. Glicoproteínas provenientes de células de la forma micelar incubadas durante 180 min. con  $[U-^{14}C]$ glucosa fueron tratadas con proteasa y los glicopéptidos resultantes cromatografiados por una columna (1,25 x 120 cm) de Biogel P6. Se recogieron fracciones de 1,8 ml contando la radioactividad presente en alícuotas de 25  $\mu$ l.

B. Electroforesis. Las fracciones indicadas con la barra en A fueron juntadas y se sometieron las sustancias presentes en ellas a electroforesis en papel en ácido fórmico 5 %.

C. Tratamiento con Endo H. La zona del electroforetograma de B indicado con la barra fue eluido y las sustancias eluidas tratadas con Endo H. Los productos fueron sometidos nuevamente a electroforesis en ácido fórmico.

1. Azul de dextrano, 2. Volumen de inclusión, G. glucosa.

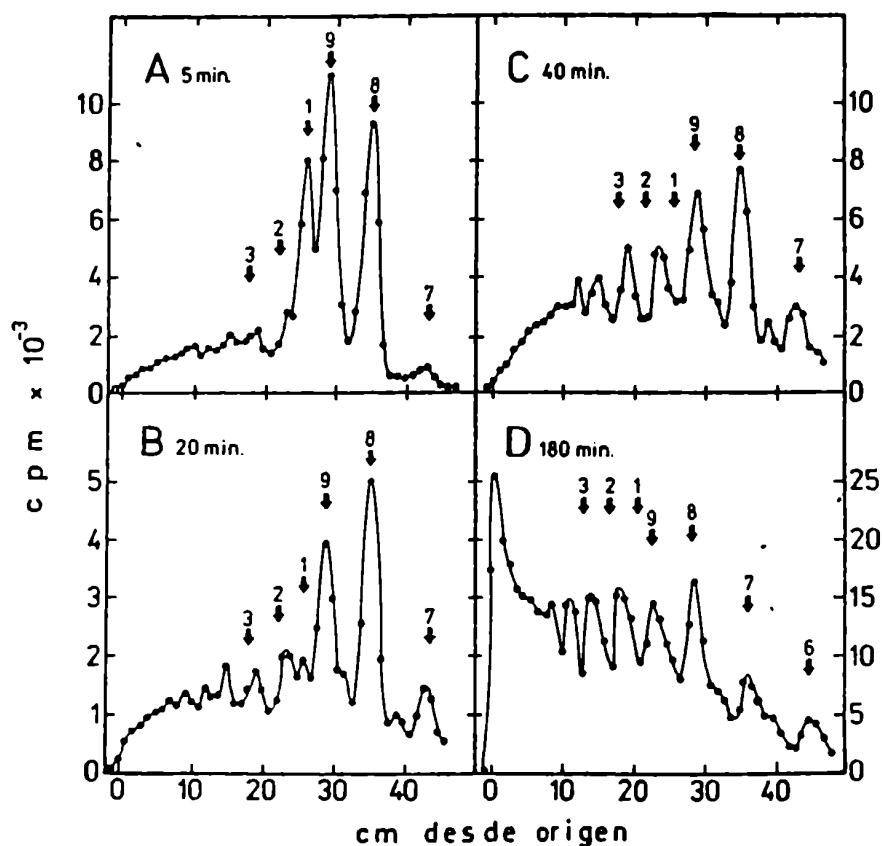


Fig. 44. Cromatografía en papel de oligosacáridos con unión N-glicosídica de la forma *micelio*. Las células fueron incubadas por los tiempos indicados con [U-<sup>14</sup>C]glucosa y se aislaron los oligosacáridos como fue descrito. Se usó solvente A y los siguientes *standards*: 6. Man<sub>6</sub>GlcNAc, 7. Man<sub>7</sub>GlcNAc, 8. Man<sub>8</sub>GlcNAc, 9. Man<sub>9</sub>GlcNAc, 1. Glc<sub>1</sub>Man<sub>8</sub>GlcNAc, 2. Glc<sub>2</sub>Man<sub>7</sub>GlcNAc, 3. Glc<sub>3</sub>Man<sub>6</sub>GlcNAc.

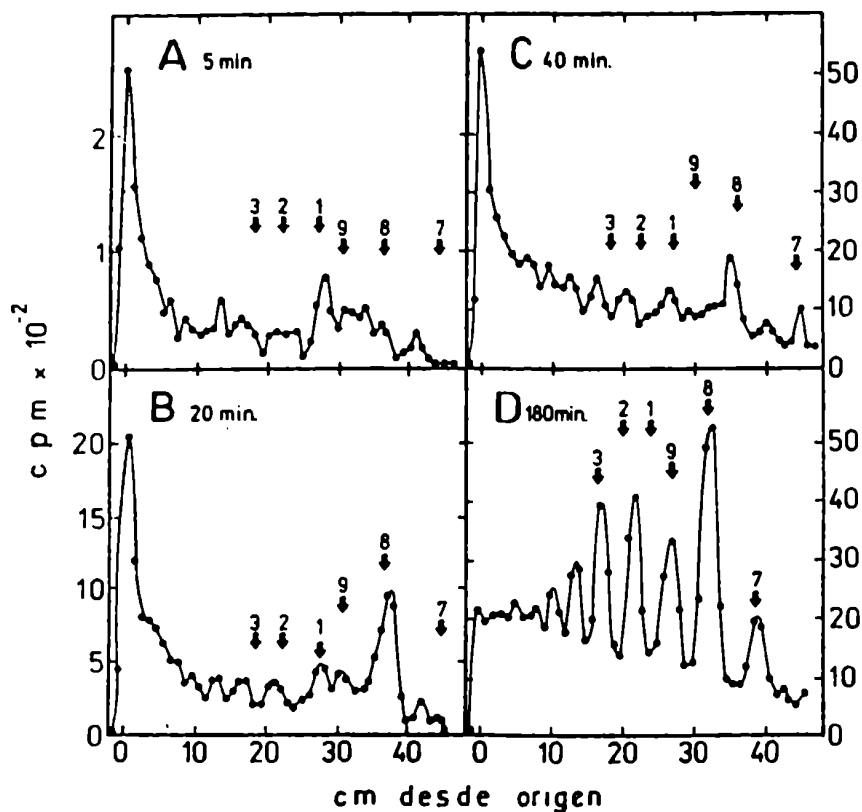


Fig. 45. Cromatografía en papel de oligosacáridos con unión N-glicosídica de la forma *levadura*. Idem fig. 44. Se usaron en este caso células de la forma *levadura*.

diferencias entre las dos formas del hongo: En la *levadura* los oligosacáridos más grandes (que aparecen en el origen o cerca de él) resultaron marcados incluso en la muestra con 5 minutos de incorporación (fig. 45 A). En el *micelio*, en cambio, sólo se obtuvo marcación de esos compuestos luego de 180 min. de incorporación (fig. 44 D). La aparente disminución de estos oligosacáridos grandes a tiempos largos en la forma *levadura* (fig. 45 D) fue debida probablemente a que aumentaron de tamaño hasta quedar excluidos en una de las etapas de purificación: la filtración por gel de los glicopéptidos. Efectivamente, al tomar las fracciones excluidas de esta columna en la muestra de la forma *levadura* de 180 min. de incorporación, se liberaron oligo-(poli-)sacáridos por tratamiento con Endo H que no migraron en la cromatografía en papel (fig. 46). Por hidrólisis total de estos compuestos se obtuvieron los mismos azúcares que de los oligosacáridos provenientes de glicopéptidos incluidos en la columna, como veremos más adelante.

En ambas formas, pero más claramente en la forma *micelar*, se vio que a tiempos breves ocurrió incorporación en oligosacáridos que migraron como  $\text{Glc}\rightarrow\text{Man}\rightarrow\text{GlcNAc}$ ,  $\text{Glc}_1\text{Man}\rightarrow\text{GlcNAc}$ ,  $\text{Man}\rightarrow\text{GlcNAc}$ ,  $\text{Man}\rightarrow\text{GlcNAc}$ . Luego fueron desapareciendo los compuestos que corrían como los standards glucosilados, para quedar como productos finales una serie que comigró con standards de  $\text{Man}\rightarrow\text{GlcNAc}$ . Este esquema estaría de acuerdo con un procesamiento de oligosacáridos transferidos a partir del lípido-oligosacárido  $\text{Glc}\rightarrow\text{Man}\rightarrow\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$  (ver sección A.III.2.a.v)

#### V.1. SEPARACION DE OLIGOSACARIDOS POR ELECTROFORESIS EN BORATO DE SODIO:

Se intentó una separación por electroforesis en papel en borato de sodio. El borato forma complejos con compuestos poli-

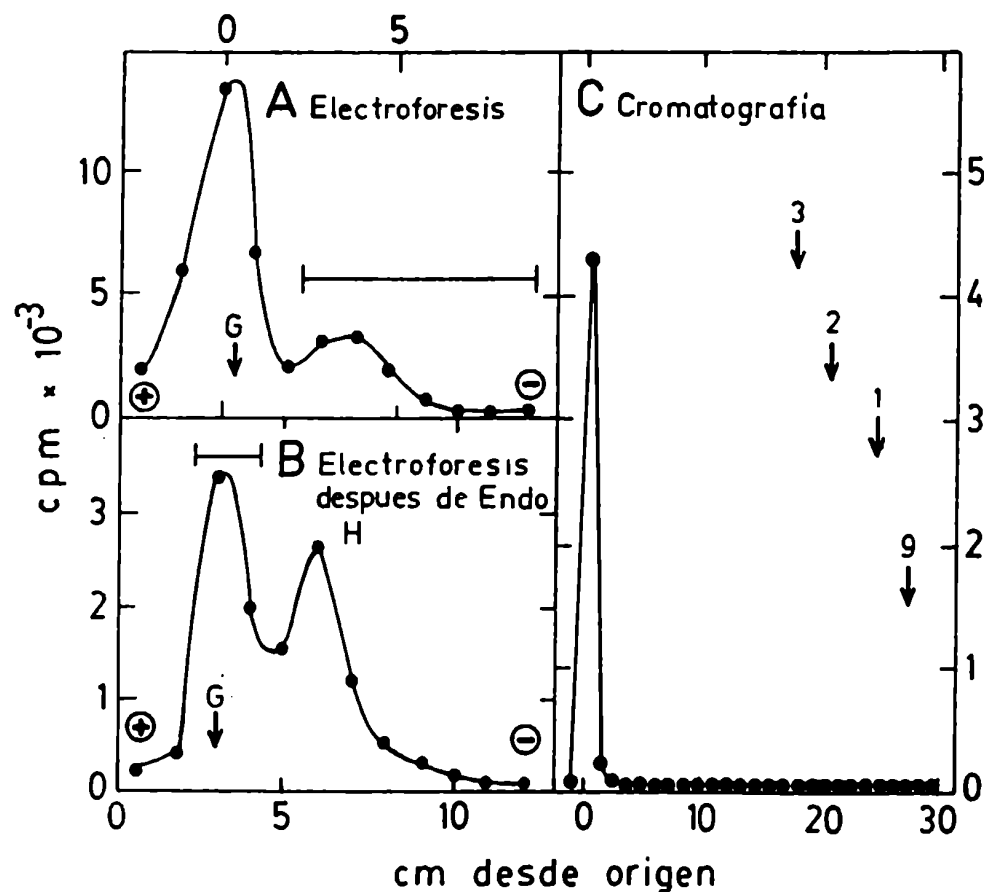


Fig. 46. Glicopéptidos excluidos de Biogel P6.

A. Electroforesis en ácido fórmico. Glicopéptidos provenientes de células de la forma levadura incubadas con [U-<sup>14</sup>C]glucosa durante 180 min. excluidos en filtración por una columna de Biogel P6 (120 x 1,25 cm) fueron sometidos a electroforesis en ácido fórmico 5 % (a 1500 V por 2 hs.).

B. Tratamiento con Endo H. Las sustancias correspondientes al pico cargado positivamente en A (barra) fueron eluidas y tratadas con Endo H. Los productos se sometieron nuevamente a electroforesis en ácido fórmico 5 %.

C. Cromatografía en papel de oligosacáridos liberados. Las sustancias correspondientes al pico neutro en B (barra) fueron eluidas y cromatografiadas en papel en solvente A.

Standards: G. glucosa, 1,2,3,9.- como en fig. 44.

hidroxilados y el complejamiento es diferente dependiendo de los azúcares involucrados y sus uniones. Esta propiedad se ha utilizado para separar oligosacáridos provenientes de glicoproteínas <sup>46</sup>.

Cada uno de los picos de las figuras 44 y 45 se separaron por este método en tres poblaciones diferentes. Los oligosacáridos que migraban como un standard de  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$  se diferenciaron en un compuesto principal de migración rápida y cantidades mucho menores de otros dos compuestos. Esto ocurrió para las dos formas celulares del hongo (fig. 47 A y B). En cambio, para compuestos mayores, por ejemplo los que migraban como  $\text{Man}_{12}\text{GlcNAc}$ , la proporción de los dos oligosacáridos de migración más lenta era mucho mayor en las muestras provenientes de la forma micelar (fig. 47 C y D).

Estos diferentes tipos de oligosacáridos no se pudieron separar por otros métodos, por ejemplo HPLC (fig. 48).

## V.2. TRATAMIENTO CON $\alpha$ -MANOSIDASA:

Los oligosacáridos separados por electroforesis en papel mostraron diferente sensibilidad a la degradación con  $\alpha$ -manosidasa. Los compuestos de mayor migración se degradaron totalmente a manosa y el disacárido  $\text{Man}_2\text{GlcNAc}$  (fig. 49 y 50 C) Esto indica que su fórmula general era  $\text{Man}_n\text{Man}_2\text{GlcNAc}$ . Los de menor migración fueron totalmente resistentes al tratamiento (fig. 49 y 50 A) y los de migración intermedia mostraron una degradación parcial (fig. 49 y 50 B).

## V.3. TRATAMIENTO CON $\alpha$ -MANOSIDASA POSTERIOR A OTROS TRATAMIENTOS QUÍMICOS Y ENZIMÁTICOS:

Para investigar qué sustituyente hacía resistentes los

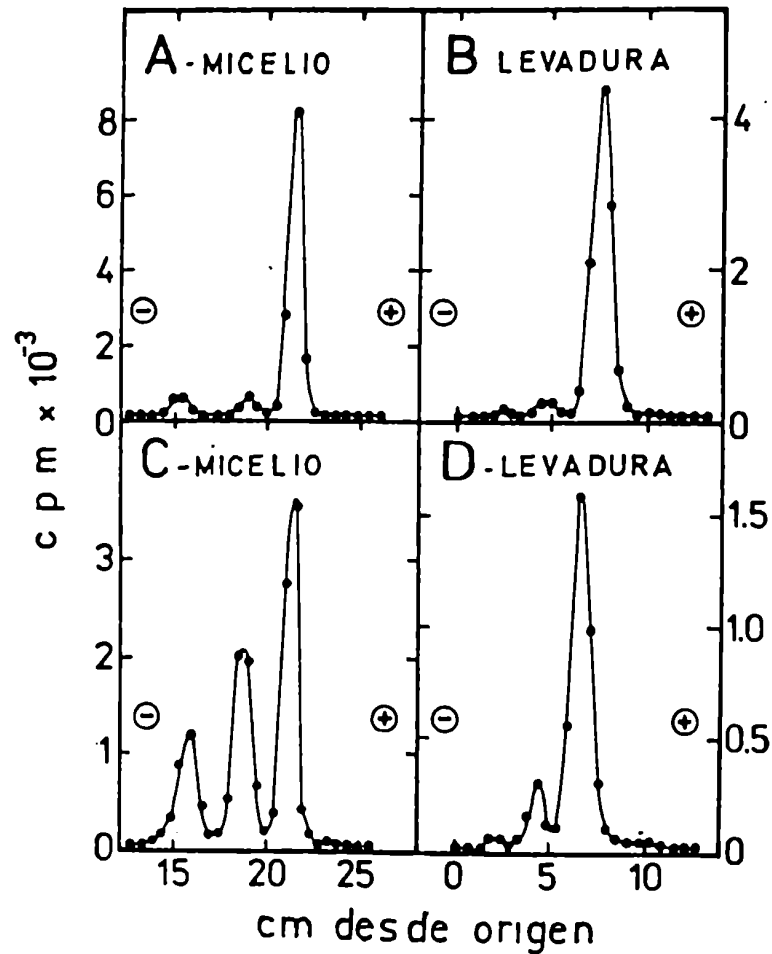


Fig. 47. Electroforesis en papel en buffer tetraborato de sodio. Los oligosacáridos que migraban como standards  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$  (A y B) y  $\text{Man}_{12}\text{GlcNAc}$  (C y D) se eluyeron de los cromatogramas de las figuras 44 y 45 y sometieron a electroforesis en papel en buffer tetraborato de sodio 50 mM, pH 9,5 por 4 hs. a 1600 V.



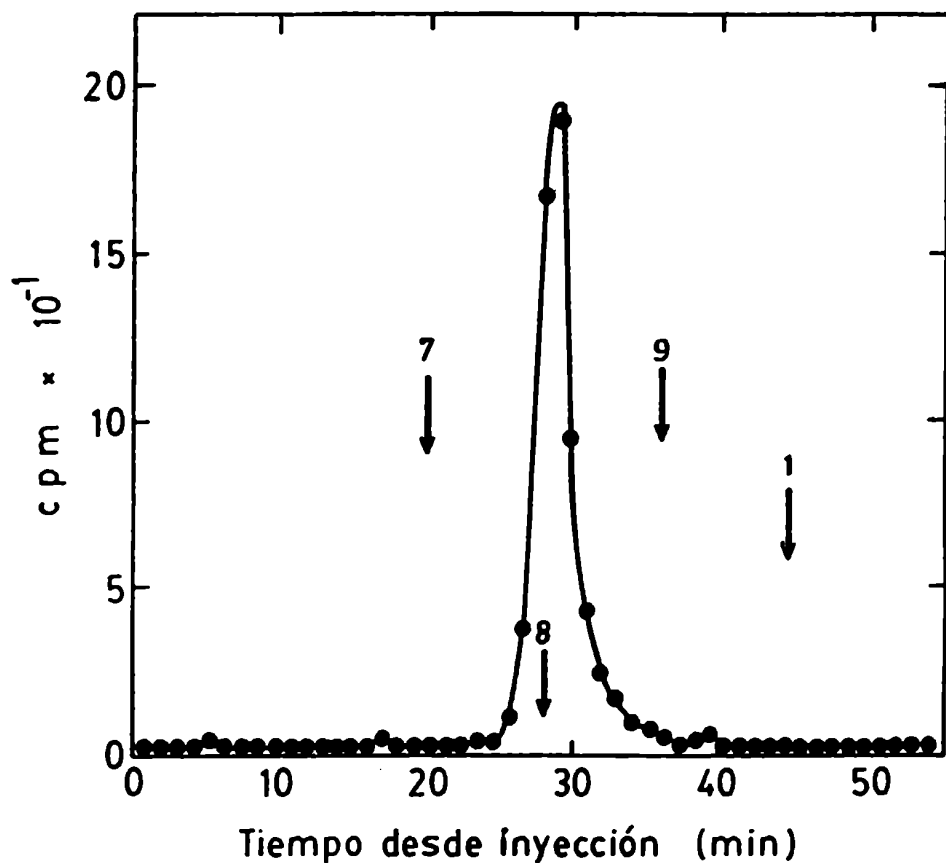


Fig. 48. HPLC de oligosacáridos con unión N-glicosídica a proteína. Oligosacáridos que migraron en cromatografía en papel como Man $\alpha$ GlcNAc standard (fig. 44 D) fueron eluidos y cromatografiados en HPLC en solvente 0 a un flujo de 1 ml/min. Se recogieron fracciones de 1 ml las que se contaron.  
*Standards:* Como en fig. 44.

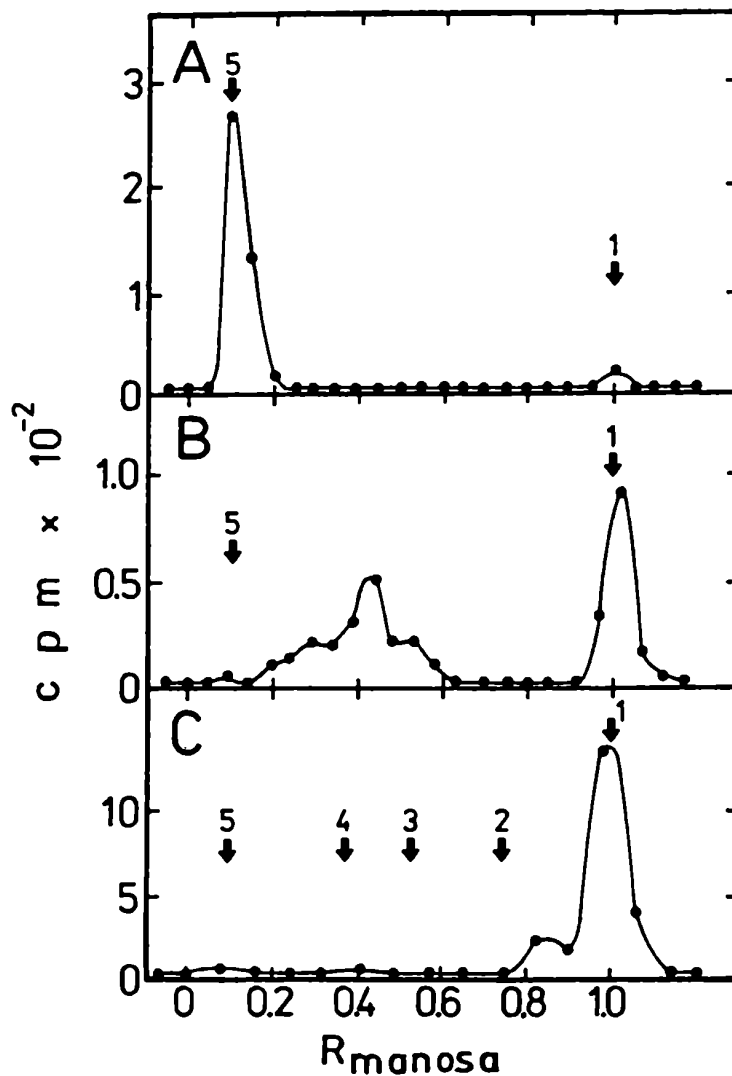


Fig. 49. Degradación de oligosacáridos con  $\alpha$ -manosidasa. Fueron eluidos los oligosacáridos de la fig. 47 A y B. Las sustancias correspondientes a los picos de menor migración (A), intermedio (B), y de mayor migración (C), se trataron exhaustivamente con  $\alpha$ -manosidasa, y corrieron luego en cromatografía en papel en solvente B. *Standards*: 1. manosa, 2. manobiosa, 3. manotriosa, 4. manotetraosa, 5. Man<sub>6</sub>GlcNAc.

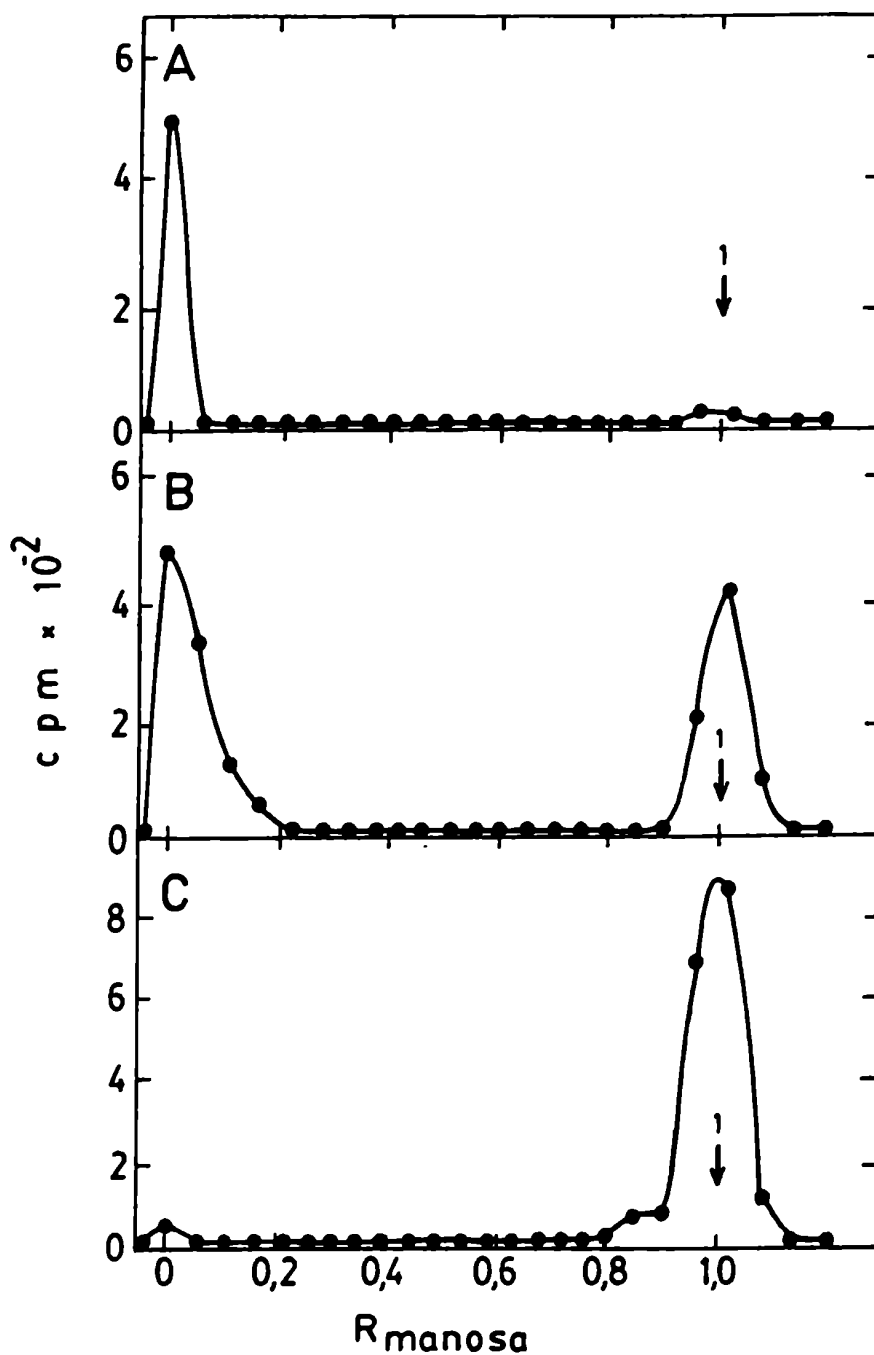


Fig. 50. Degradación de oligosacáridos grandes con  $\alpha$ -manosidasa. Idem a fig. 49. Se utilizaron en este caso oligosacáridos grandes (0 a 2 cm de fig. 44 D). *Standards* 1. manosa.

oligosacáridos a  $\alpha$ -manosidasa se realizaron diversos tratamientos químicos y enzimáticos.

Por tratamiento ácido suave (HCl 0,1 N por 120 min. a 100 °C) no se eliminó la resistencia a  $\alpha$ -manosidasa (Tabla 5). Esto descarta la presencia de acilos o piruvatos como sustituyentes. Por tratamiento alcalino suave (NaOH 0,02 N por 120 min. a 37 °C) tampoco se eliminó la resistencia a  $\alpha$ -manosidasa, descartándose por lo tanto acilos. Por tratamiento alcalino fuerte (KOH 2 N por 120 min. a 100 °C), previa reducción del oligosacárido con NaBH<sub>4</sub>, se obtuvo el mismo resultado, y esto descartó fosfatos o amidas.

TRATAMIENTO	RESISTENCIA A $\alpha$ -MANOSIDASA LUEGO DEL TRATAMIENTO
HCl 0,1 N/ 120 min./ 100 °C	SI
NaOH 0,02 N/ 120 min./ 37 °C	SI
KOH 2 N/ 120 min./ 100 °C	SI
HCl 0,5 N/ 180 min./ 100 °C	NO

Tabla 5. Tratamientos químicos a oligosacáridos totalmente resistentes a  $\alpha$ -manosidasa.

Los oligosacáridos se mostraron resistentes a tratamientos enzimáticos con  $\alpha$ - y  $\beta$ -galactosidasa (fig. 51). No se modificó la resistencia a  $\alpha$ -manosidasa luego de un tratamiento con  $\beta$ -glucosidasa,  $\beta$ -galactosidasa o  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa (Tabla 6).

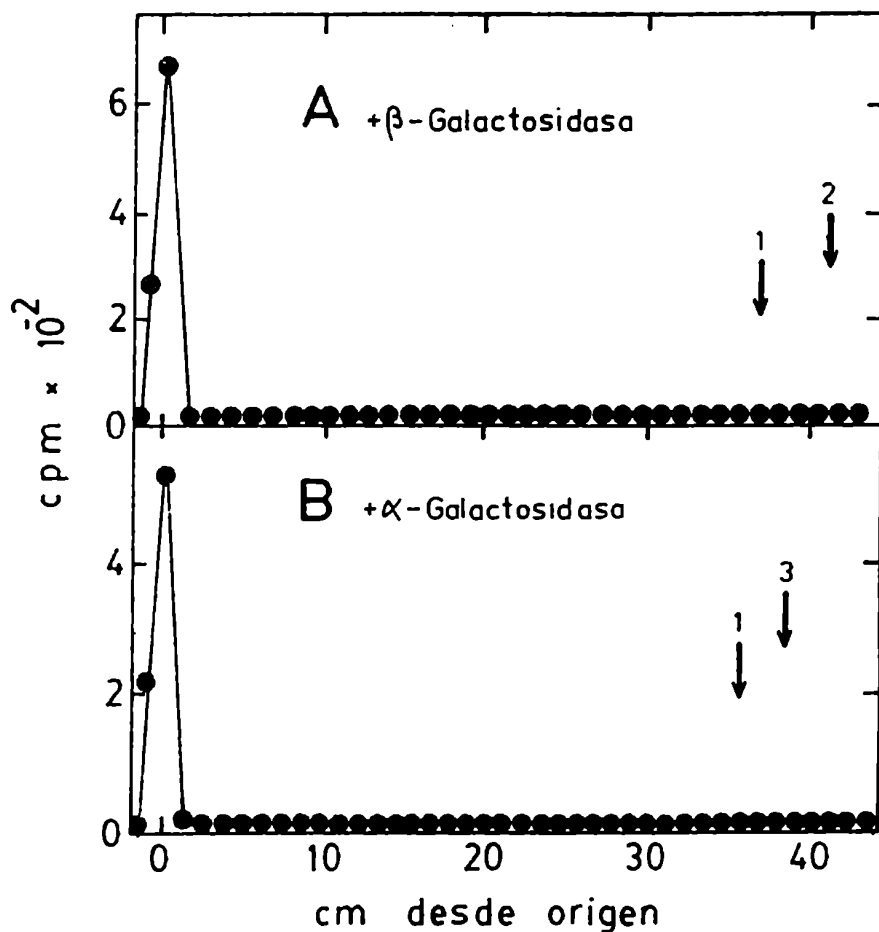


Fig. 51. Tratamiento con  $\alpha$  y  $\beta$  galactosidasa. A.  $\beta$ -Galactosidasa. Oligosacáridos grandes (1 a 3 cm de fig. 45 A), resistentes a  $\alpha$ -manosidasa fueron tratados con  $\beta$ -galactosidasa. Se cromatografiaron los productos en papel en solvente B. B.  $\alpha$ -Galactosidasa. La zona correspondiente al pico de A se eluyó y las sustancias presentes se trataron con  $\alpha$ -galactosidasa. Se cromatografiaron los productos en papel en solvente B. Standards: 1. galactosa, 2. manosa, 3. glucosa.

TRATAMIENTO	RESISTENCIA A $\alpha$ -MANOSIDASA LUEGO DEL TRATAMIENTO
$\beta$ -Glucosidasa	SI
$\beta$ -Galactosidasa	SI
$\beta$ -N-Acetilglucosaminidasa	SI

**Tabla 6. Tratamientos enzimáticos a oligosacáridos totalmente resistentes a  $\alpha$ -manosidasa.**

Se pensó que las manosas podrían estar unidas por unión  $\beta$ , y por no disponer de  $\beta$ -manosidasa se realizó el siguiente tratamiento: se hizo una hidrólisis parcial (0,5 N HCl por 3 hs. a 100 °C) de un oligosacárido resistente a  $\alpha$ -manosidasa. Se tomaron los oligosacáridos cortos así obtenidos (fig. 52 A), y se los trató con  $\alpha$ -manosidasa. Se obtuvo entonces degradación casi total a manosa, resultado que indica que las uniones internas eran  $\alpha$  en su gran mayoría (fig. 52 B). Los pocos oligosacáridos cortos resistentes debieron conservar el sustituyente desconocido en su extremo no reductor o tener uniones  $\beta$ .

#### **V.4. SUSTITUYENTES CARGADOS:**

Se realizaron electroforesis en medios ácidos o alcalinos no ocurriendo migración de los oligosacáridos resistentes a  $\alpha$ -manosidasa, lo que indica ausencia de sustituyentes cargados (fig. 53). Por tratamiento alcalino (KOH 2 N, 30 min. a 100 °C), (luego de reducir el oligosacárido con  $\text{NaBH}_4$ ), y posterior electroforesis en medio ácido, se obtuvo un pico neutro y otro cargado, indicando la existencia de una sola hexosamina acetilada: la N-acetilglucosamina del extremo reductor (fig. 54).

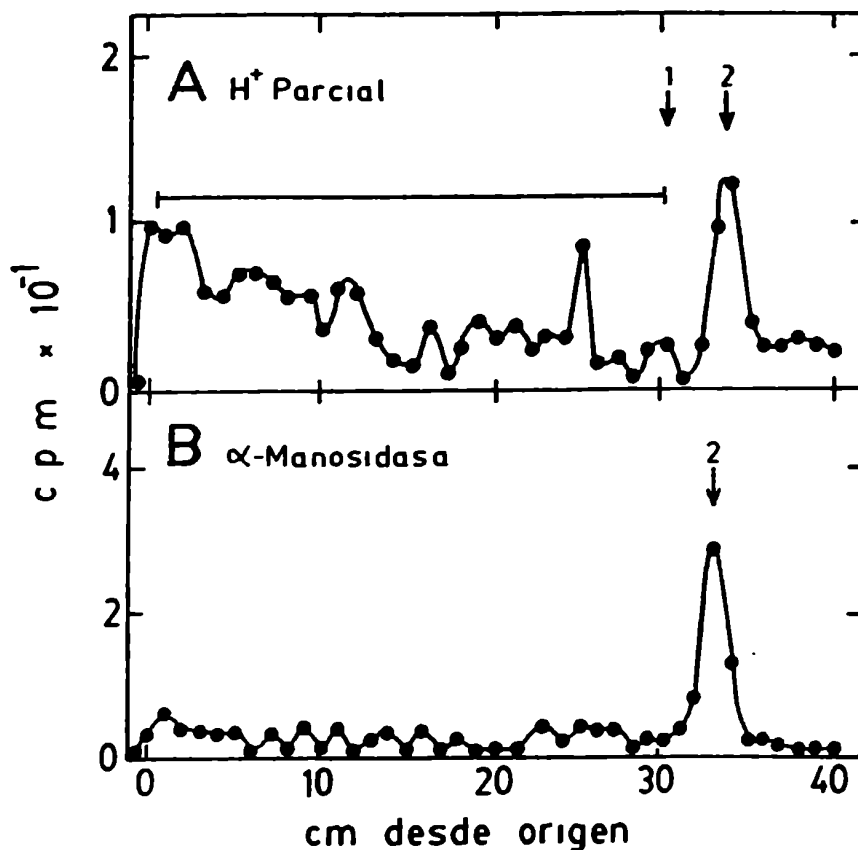


Fig. 52. Determinación de la anomeria en oligosacáridos resistentes a  $\alpha$ -manosidasa. A. Hidrólisis ácida parcial. Oligosacáridos grandes resistentes a  $\alpha$ -manosidasa (fig. 50 A) fueron sometidos a hidrólisis ácida parcial (0,5 N HCl por 3 hs. a 100° C). Se cromatografiaron los productos en solvente B. B. Tratamiento con  $\alpha$ -manosidasa. Los fragmentos obtenidos por hidrólisis (A, cm 1 a 30, barra) se eluyeron y trataron con  $\alpha$ -manosidasa y se cromatografiaron los productos en solvente E. *Standards:* 1. glucosa, 2. manosa.

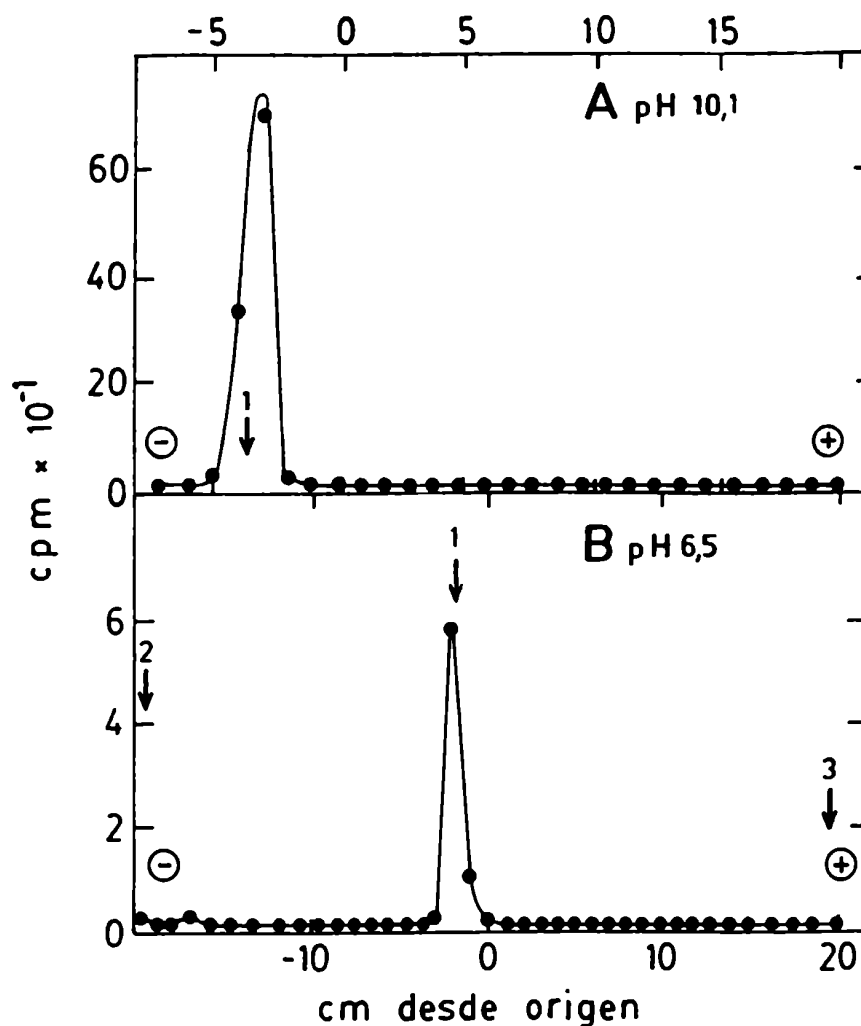


Fig. 53. Electroforesis de un oligosacárido resistente a  $\alpha$ -manosidasa. A. pH 10,1. El oligosacárido que migraba como un standard ManeGlcNAc, totalmente resistente a  $\alpha$ -manosidasa (fig. 49 A), fue sometido a electroforesis en papel en buffer carbonato/bicarbonato de sodio 0,2 M, pH 10,1. B. pH 6,5. El oligosacárido corrido en A fue eluido y sometido a electroforesis en papel en buffer acetato de piridina 1,0 M, pH 6,5. Standards: 1. glucosa, 2. glucosamina, 3. ácido glucurónico.



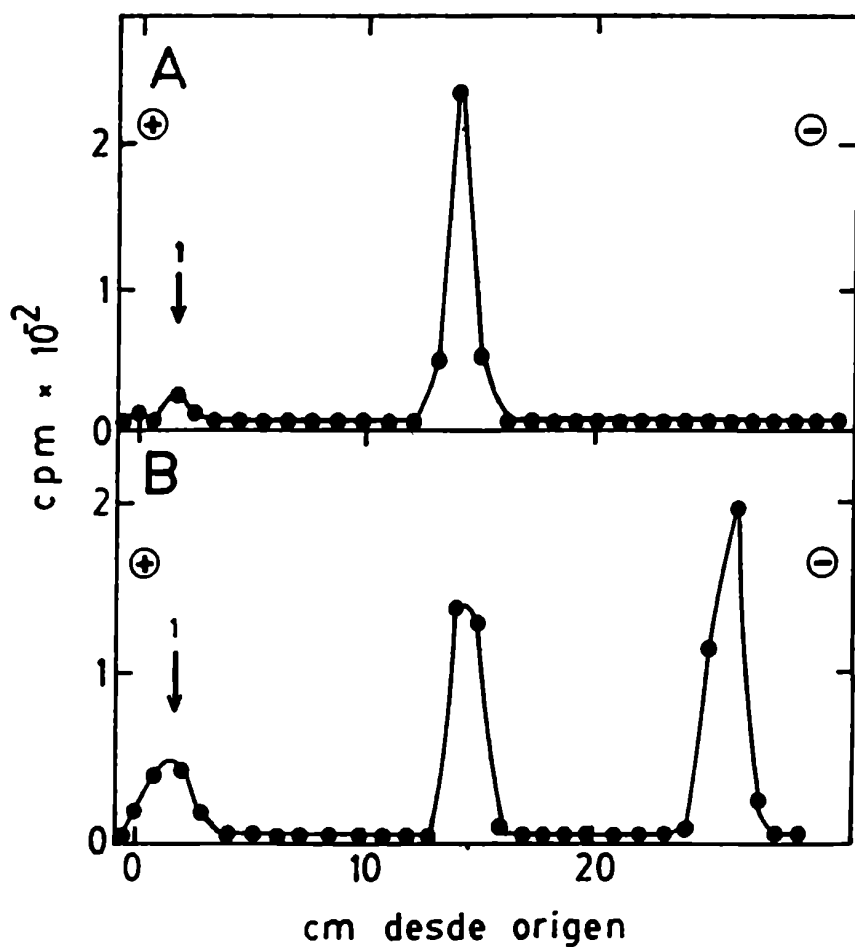


Fig. 54. Determinación del número de N-acetilglucosaminas en un oligosacárido resistente a  $\alpha$ -manosidasa. A. Un oligosacárido parcialmente resistente a  $\alpha$ -manosidasa que migró como  $\text{Man}_2\text{GlcNAc}$  (fig. 73 B) fue reducido con  $\text{NaBH}_4$  y desacetilado parcialmente con  $\text{KOH}$  2 N por 30 minutos a  $100^\circ\text{C}$ . Se sometieron los productos a electroforesis en papel en ácido fórmico 5 %. B. El mismo procedimiento se realizó con  $\text{Glc}\rightarrow\text{Man}\rightarrow\text{GlcNAc}$  proveniente del derivado de Dol-P-P de hígado de rata. *Standards*: 1. Glc.

## VI. IDENTIFICACION DE 3-O-METILMANOSA:

### VI.1. Hidrólisis ácida total:

Por hidrólisis ácida total de los oligosacáridos completamente sensibles a  $\alpha$ -manosidasa, se obtuvo manosa y glucosamina (fig. 55 C). Los que eran parcial o totalmente resistentes a la enzima produjeron también un compuesto con migración en la zona de glucuronolactona o de un azúcar metilado (fig. 55 A y B). La proporción de este compuesto resultó ser mayor en los oligosacáridos totalmente resistentes a  $\alpha$ -manosidasa.

Los oligosacáridos no eran degradados por hidrólisis ácida suave (0,1 N HCl por 120 min. a 100°C). Esto excluyó la presencia de una pentosa o desoxiazúcar. El compuesto obtenido por hidrólisis ácida total del oligosacárido permaneció neutro por electroforesis en papel en buffer de carbonato/bicarbonato de sodio (pH 10,1); se excluyó por lo tanto la posibilidad de que fuera una lactona.

### VI.2. Tratamiento de des-eterificación:

Dado que el compuesto producido por hidrólisis ácida total de los oligosacáridos parcial o totalmente resistentes a  $\alpha$ -manosidasa corría como 3-O-metilglucosa en cromatografía en papel, para investigar si dicho compuesto pudiera tratarse de un azúcar metilado en un carbono que no fuera el anomérico, se procedió a tratarlo con tribromuro de boro, reactivo de des-eterificación (de-metilación). Luego de este tratamiento, el compuesto dio un producto que migró en cromatografía en papel en solvente C como manosa (fig. 56). Por reducción de este compuesto con borohidruro de sodio se obtuvo una sustancia que migró como manitol en cromatografía en papel en solvente C. En este tipo de

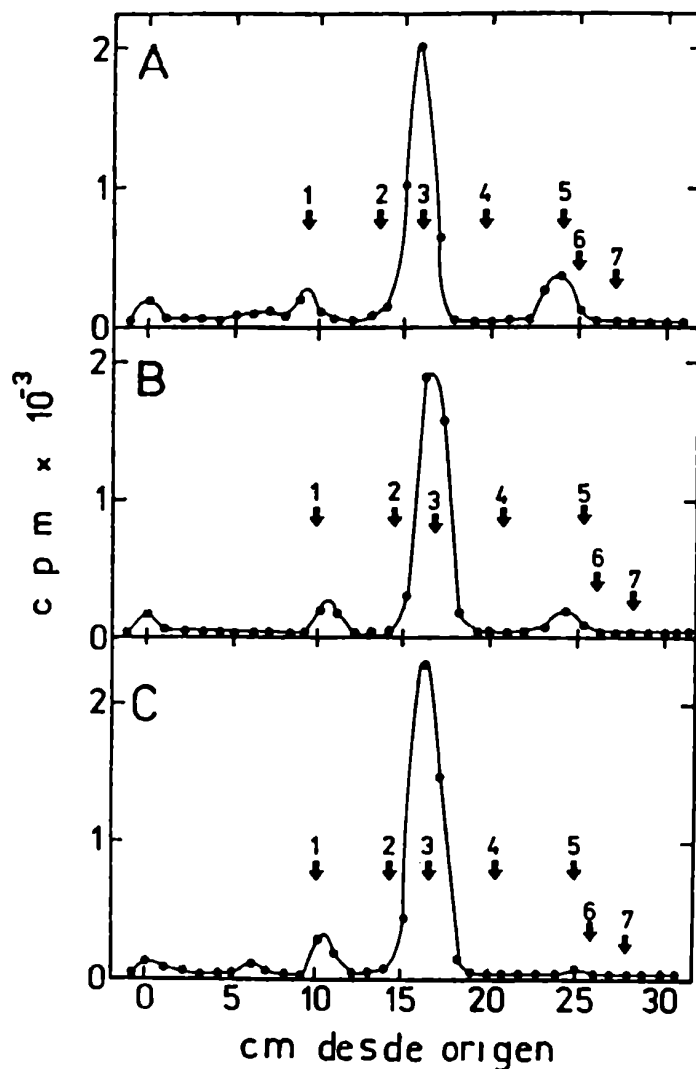


Fig. 55. Hidrólisis ácida total de oligosacáridos. Se eluyeron oligosacáridos que migraron como  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}$  del cromatograma de la fig. 44 D y se separaron por electroforesis en borato. Los compuestos de menor migración (A), intermedia (B) y mayor (C), se sometieron a hidrólisis ácida total ( $\text{HCl}$  1 N por 4 hs. a  $100^\circ\text{C}$ ). Los productos se cromatografiaron en papel en solvente C. *Standards*: 1. glucosamina, 2. glucosa, 3. manosa, 4. fucosa, 5. 3-O-metilglucosa, 6.  $\alpha$ -metilmanosido, 7. glucuronolactona.

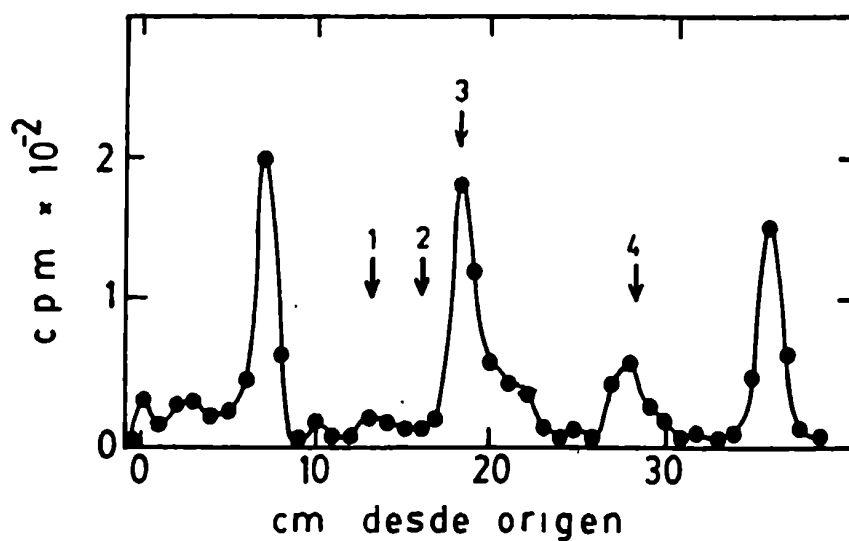


Fig. 56. Demetilación. El compuesto desconocido fue sometido a tratamiento de deseterificación (demetilación) con BBr<sub>3</sub>. Los productos se cromatografiaron en papel en solvente C. **Standards:** 1. galactosa, 2. glucosa, 3. manosa, 4.  $\alpha$ -metilmanosido.

reacción ocurren reacciones secundarias de degradación y condensación. Sin embargo, los productos con migración diferente de manosa no modificaron su migración en solvente C por reducción. Productos con idéntica migración se obtuvieron por tratamiento de 3-O-metilglucosa con  $\text{BBr}_3$ , salvo la hexosa obtenida, que en este caso fue glucosa.

### VI.3. Posición de la sustitución:

#### VI.3.a) Tratamiento con periodato de sodio:

Para estudiar la posición de la sustitución en los residuos de manosa se trató al compuesto desconocido, obtenido por hidrólisis total de oligosacáridos resistentes a  $\alpha$ -manosidasa, con periodato de sodio luego de transformarlo en su metilglicosido (fig. 57 A). Seguidamente se redujo el producto con borohidruro de sodio. Luego se sometió el producto a hidrólisis ácida total para eliminar el metilo del carbono anomérico. El compuesto no se degradó, migrando como la sustancia original en cromatografía en papel en solvente C (fig. 57 B). Como en este solvente el compuesto tiene migración muy similar a glicerol, (siendo este un posible producto de ruptura entre carbonos 3 y 4), se sometió el producto a electroforesis en buffer borato (solvente N) y en este sistema sí se separaron las dos sustancias (fig. 57 C), migrando el compuesto tratado como el original.

Este resultado indica una sustitución en la posición 3 de la manosa. Esta es la única sustitución que hace imposible la existencia de hidroxilos libres en carbonos vecinos, haciendo por lo tanto al compuesto resistente a la oxidación con periodato.

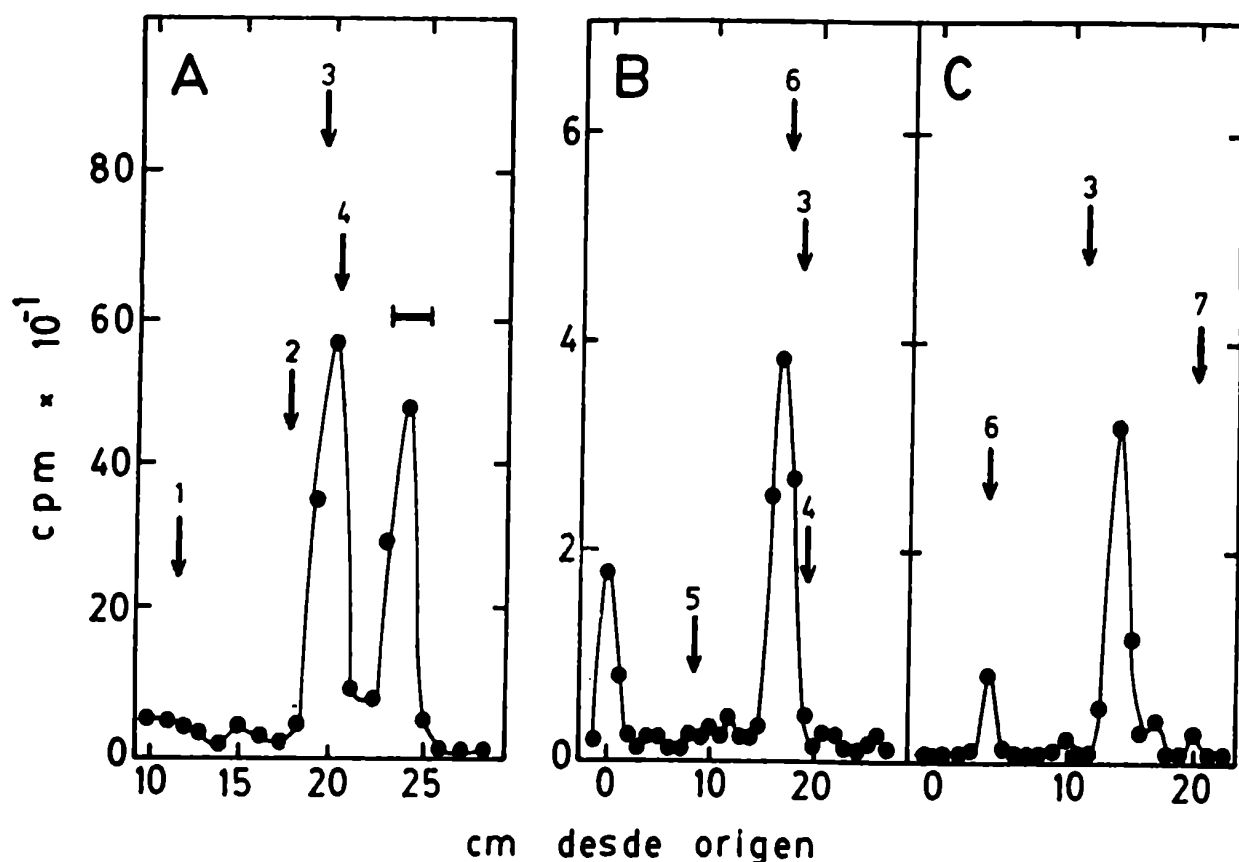


Fig. 57. Tratamiento con periodato del compuesto desconocido

A. Preparación del metil-glicósido. El compuesto desconocido obtenido por hidrólisis ácida total de oligosacáridos totalmente resistentes a  $\alpha$ -manosidasa (fig. 55 A y B) se trató con resina Dowex 50 H<sup>+</sup> anhidra en metanol anhidro por 2 hs. a 100 °C. Los productos se cromatografiaron en papel en solvente C.

B. Tratamiento con periodato. El metil-glicósido preparado (cm 23 y 24 de A, barra) se eluyó y trató con periodato de sodio, luego se redujo con NaBH<sub>4</sub>, y a continuación se sometió a hidrólisis ácida total cromatografiando los productos en papel en solvente C.

C. Electroforesis. La zona del cromatograma ilustrado en B correspondiente al pico que migró se eluyó y sometió a electroforesis en papel en buffer tetraborato de sodio 15 mM, pH 9,5.

Standards: 1. Glc, 2.  $\alpha$ -metilglucosido, 3. 3-O-MeGlc 4.  $\alpha$ -metilmanosido, 5. sorbitol, 6. glicerol, 7. 3-O-metilsorbitol.

VI.3.b) Electroforesis en molibdato de sodio:

Por electroforesis en molibdato de sodio, (pH 5,0) los alditos sustituidos en posición 3 no migran, por no formar complejo, y sí lo hacen los sustituidos en otras posiciones <sup>336</sup>. El compuesto estudiado sometido a electroforesis en este buffer, luego de reducción con borohidruro de sodio, no migró, confirmando la sustitución en 3 (fig. 58). Por no disponerse de derivados monometilados de manitol, se comparó el comportamiento del compuesto con el de derivados monometilados de sorbitol. Efectivamente el único derivado que no migró fue el 3-O-metil sorbitol (fig. 58).

VII. MARCACION DE OLIGOSACARIDOS CON [metil-<sup>14</sup>C]METIONINA:

VII.1. MARCACION:

La migración similar a 3-O-metilglucosa del compuesto estudiado sugería que el grupo sustituyente se trataba de un O-metilo. Para confirmar esto se incubaron células de la forma micelio con [metil-<sup>14</sup>C]metionina. Se aislaron los oligosacáridos unidos N-glicosídicamente a proteína, como fue descrito en la sección B.III.5, y se corrieron en cromatografía en papel. Se obtuvieron compuestos que migraron como oligosacáridos con 5, 6 ó más unidades de manosa (fig. 59 A).

Por electroforesis en borato de sodio se obtuvieron los dos oligosacáridos de menor migración y no así el tercero, formado sólo por Man y GlcNAc que se obtenía cuando se incubaban las células con [U-<sup>14</sup>C]glucosa (fig. 59 B y C). Por tratamiento con  $\alpha$ -manosidasa, como era de esperar, el oligosacárido de menor migración resultó ser totalmente resistente mientras que

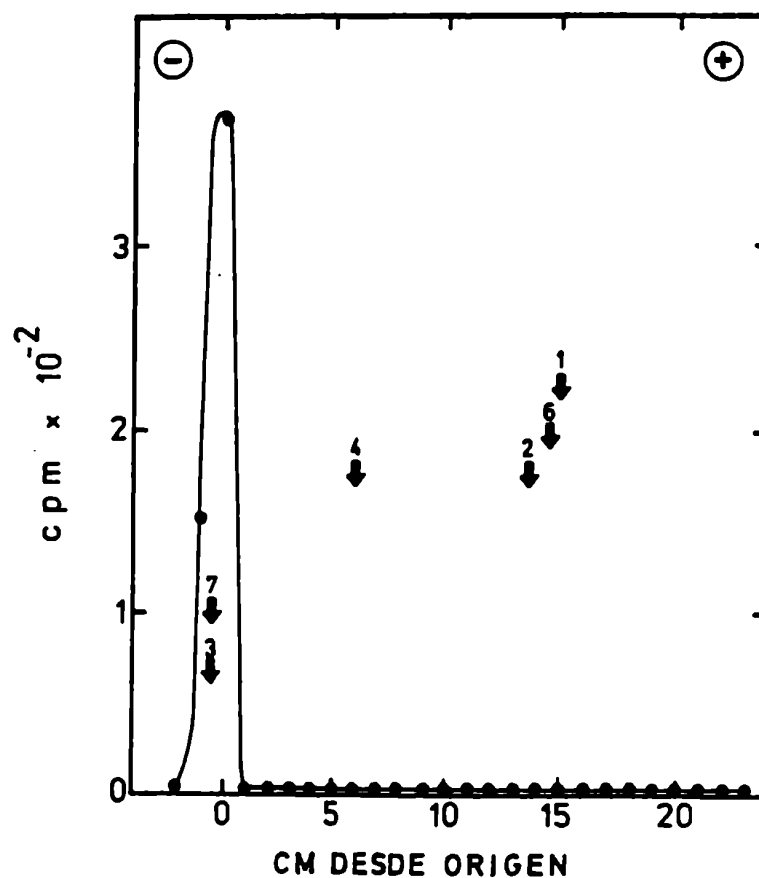


Fig. 58. Electroforesis en papel del compuesto desconocido reducido. El compuesto que migraba como 3-O-metilglucosa en los cromatogramas de la fig. 55 A y B se redujo con borohidruro de sodio. El producto se sometió a electroforesis en papel en molibdato de sodio pH 5,0. *Standards*: 1. sorbitol, 2. 2-O-metilsorbitol, 3. 3-O-metilsorbitol, 4. 4-O-metilsorbitol, 6. 6-O-metilsorbitol, 7. 3-O-metilglucosa.



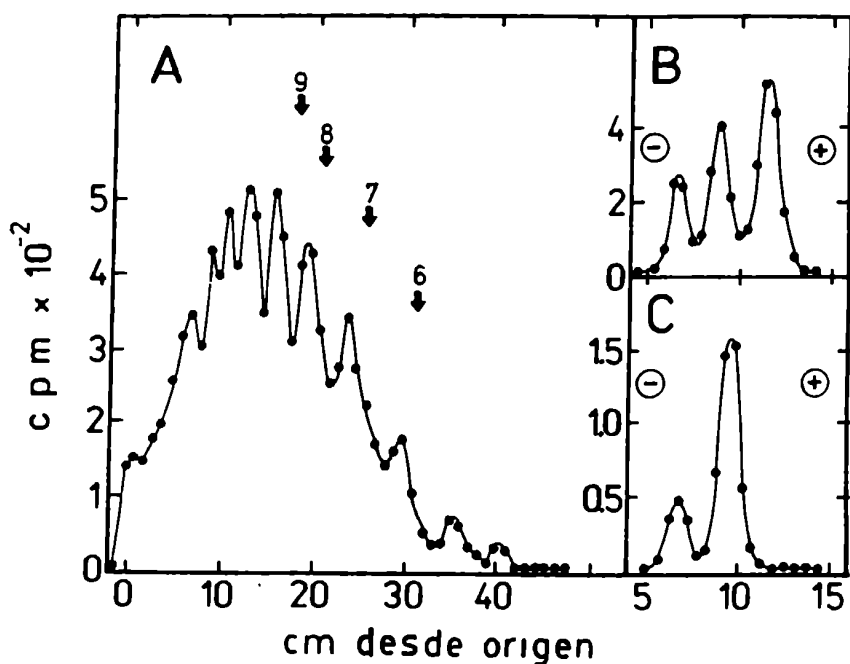


Fig. 59. Oligosacáridos con unión N-glicosídica marcados en células incubadas con [metil-<sup>14</sup>C]metionina.

A. Cromatografía en papel. Se aislaron oligosacáridos de células incubadas por 30 min. con el precursor marcado y corrieron en cromatografía en papel en solvente A. *Standards* como en fig. 44.

B y C. Electroforesis en papel en tetraborato de sodio. Los compuestos que migraron como Man<sub>12</sub>GlcNAc en cromatografía, aislados de células incubadas con [<sup>14</sup>C]glucosa (B) o [metil-<sup>14</sup>C]metionina (C) se corrieron en electroforesis en papel.

el otro fue parcialmente degradado.

Por hidrólisis total de los oligosacáridos se obtuvo solamente una sustancia que migró como 3-O-metilglucosa (fig. 60 A). Esta sustancia fue reducida con borohidruro de sodio y el compuesto resultante se cromatografió en papel (fig. 60 B). El compuesto se eluyó y sometió a des-eterificación con tribromuro de boro. Luego de esta reacción se cromatografió el producto en papel, pero como cabía esperar se había perdido la marca radioactiva.

## VII.2. MARCACION Y CHASE CON [metil- $^{14}$ C] METIONINA:

Para estudiar en qué etapa ocurría metilación se incubaron células de la forma micelio con [metil- $^{14}$ C]metionina por 30 min., seguido de *chase* con metionina no marcada, por 10 hs. El perfil cromatográfico de los oligosacáridos separados de proteína por Endo H fue muy similar al obtenido antes del *chase* (fig. 61).

Se realizó un análisis de metilación de oligosacáridos grandes de antes y después del *chase* (cm 0 a B de fig. 61 A y B). Por cromatografía en capa delgada se observó solo 2,3,4,6 tetra-O-metilmanosa, (fig. 62 A y B) indicando que la metilación *in vivo* sólo ocurre en extremos no reductores y que una vez que entró el metilo no se agregan mas azúcares a ese extremo.

## VIII. MARCACION Y CHASE CON N-ACETIL-[ $^3$ H]GLUCOSAMINA:

Dado que se encontraron N-acetil glucosaminas sólo en el extremo reductor de los oligosacáridos N-glicosídicos por marcación y *chase* con N-acetil glucosamina marcada se podría seguir la transferencia y procesamiento de esos oligosacáridos.

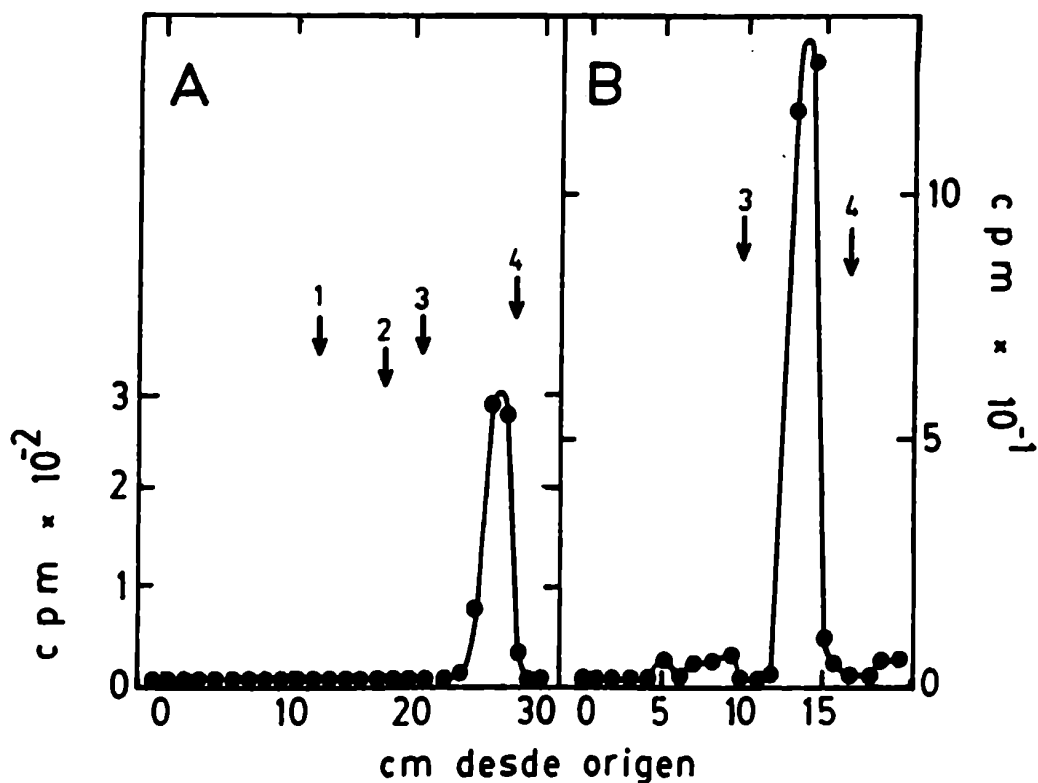


Fig. 60. Hidrólisis total de oligosacáridos marcados en células incubadas con [metil-<sup>14</sup>C]metionina.

A. Los oligosacáridos de fig. 59 C se eluyeron, juntaron y sometieron a hidrólisis ácida total (HCl 1 N por 4 hs. a 100 °C), y el producto se corrió en cromatografía en papel en solvente C.

B. El producto de A se eluyó, redujo con NaBH<sub>4</sub> y cromatografió en solvente C.

Standards: 1. GlcNH<sub>2</sub>, 2. Glc, 3. Man, 4. 3-O-MeGlc.

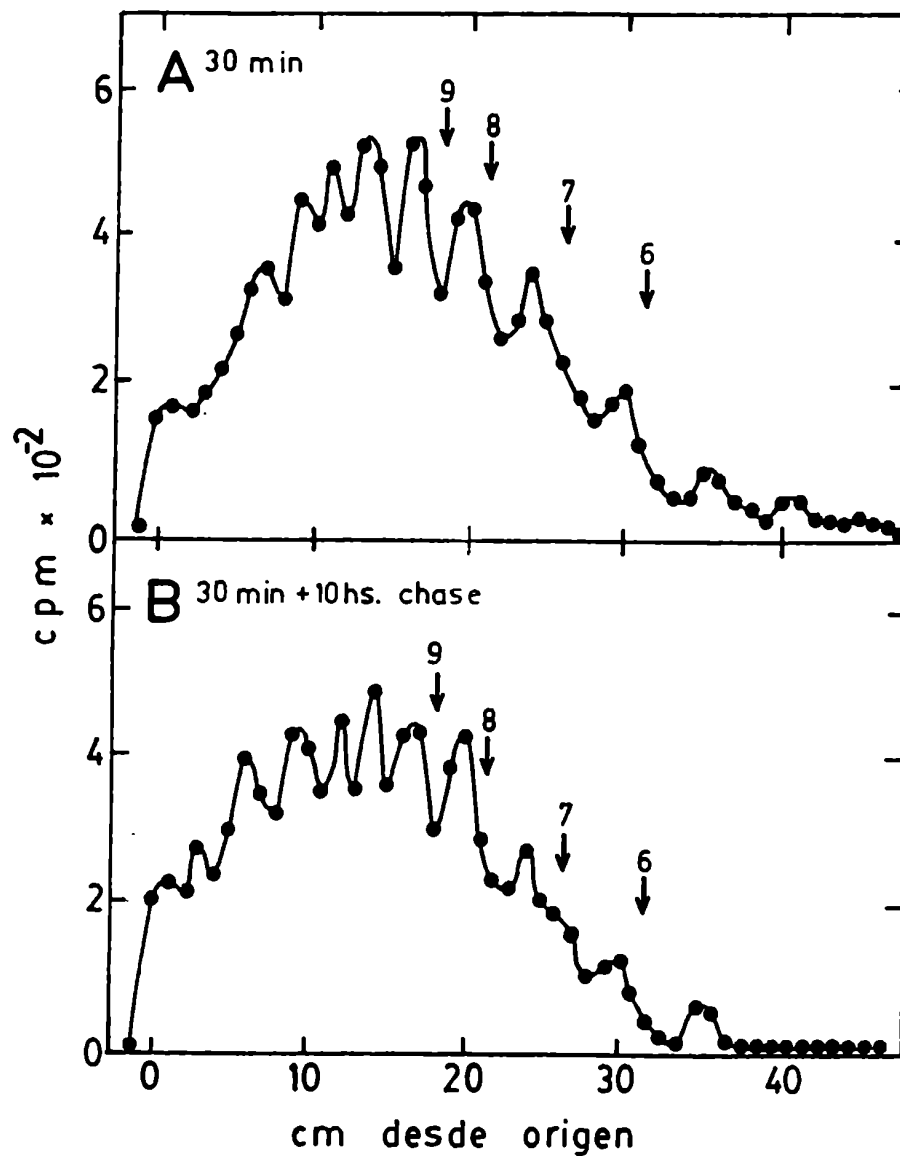


Fig. 61. Marcación y *chase* con [metil-<sup>14</sup>C]metionina. Se aislaron oligosacáridos separados de proteína con Endo H marcados en células incubadas con [metil-<sup>14</sup>C]metionina por 30 min. (A) ó por 30 min. seguido de *chase* con metionina no marcada por 10 hs. (B). Se cromatografiaron en papel en solvente A. *Standards*: Como en fig. 44.

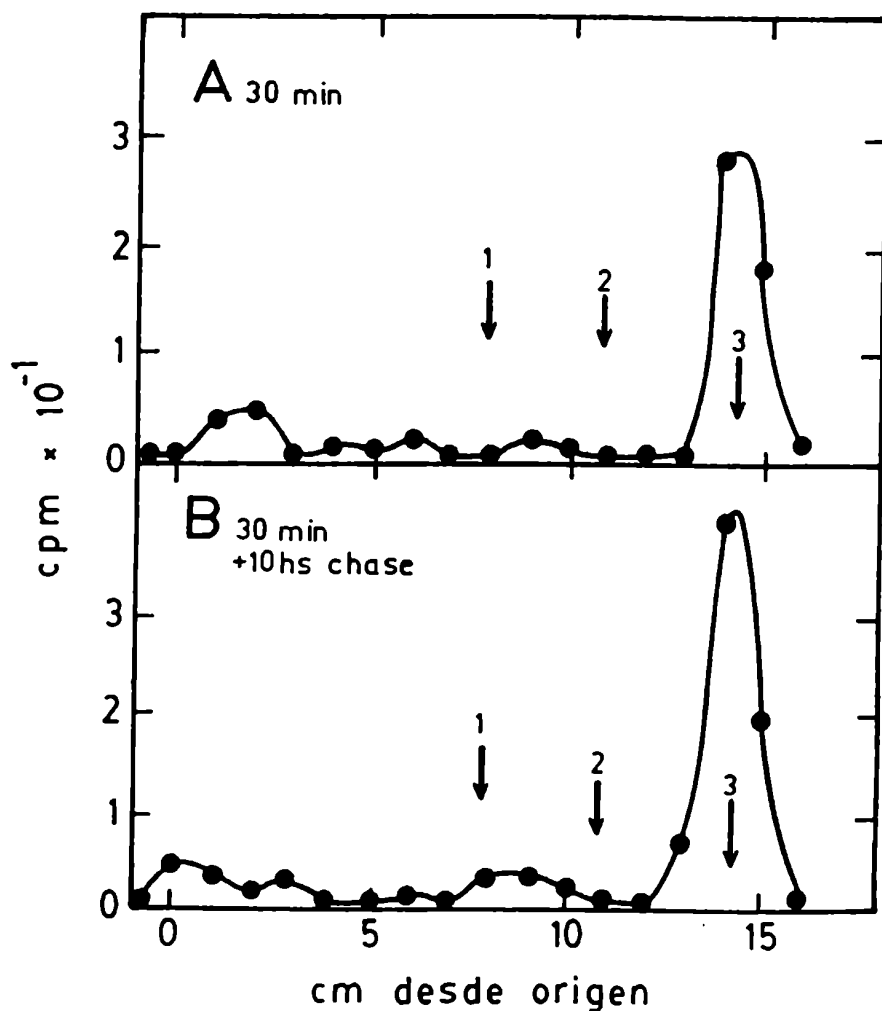


Fig. 62. Permetilación de oligosacáridos grandes provenientes de células incubadas con [metil- $^{14}\text{C}$ ]metionina. Oligosacáridos grandes marcados en células incubadas con [metil- $^{14}\text{C}$ ]metionina por 30 min. (A) ó 30 min. + 10 hs. de chase (B) (eluidos de cm 0 a 8, fig. 61 A y B) fueron permetilados. Fueron luego hidrolisados con HCl 1 N por 4 hs. a  $100^\circ\text{C}$ , y los productos cromatografiados en TLC en solvente H. *Standards*: 1. 3,4,6 tri-O-MeMan, 2. 2,4,6 tri-O-MeMan, 3. 2,3,4,6 tetra-O-MeMan.

Se incubaron células de la forma micelio con N-acetil-[1,6-<sup>3</sup>H] glucosamina por 5 minutos. Luego se realizó un *chase* con medio YPG por 0, 15 y 180 minutos. Los oligosacáridos unidos N-glicosídicamente a proteína se aislaron, como fue descrito anteriormente (sección B.III.5), y se corrieron en cromatografía en papel en solvente A. En la figura 63 A, luego del pulso de 5 min. se observa como primeros pasos del procesamiento la marcación de sustancias que migran como Glc<sub>1</sub>Man $\rightarrow$ GlcNAc, Man $\rightarrow$ GlcNAc y Man $\rightarrow$ GlcNAc.

Luego del *chase* se ve que los oligosacáridos aumentan de tamaño (agregado de residuos de manosa y metilación). El proceso es rápido, ya que luego de sólo 15 minutos de *chase* ya prácticamente se ha completado el procesamiento (fig. 63 B y C). Además, el perfil obtenido luego de 5 minutos de pulso no difiere mucho del obtenido luego de 180 min. de *chase*, lo que refuerza la idea de un procesamiento extremadamente rápido.

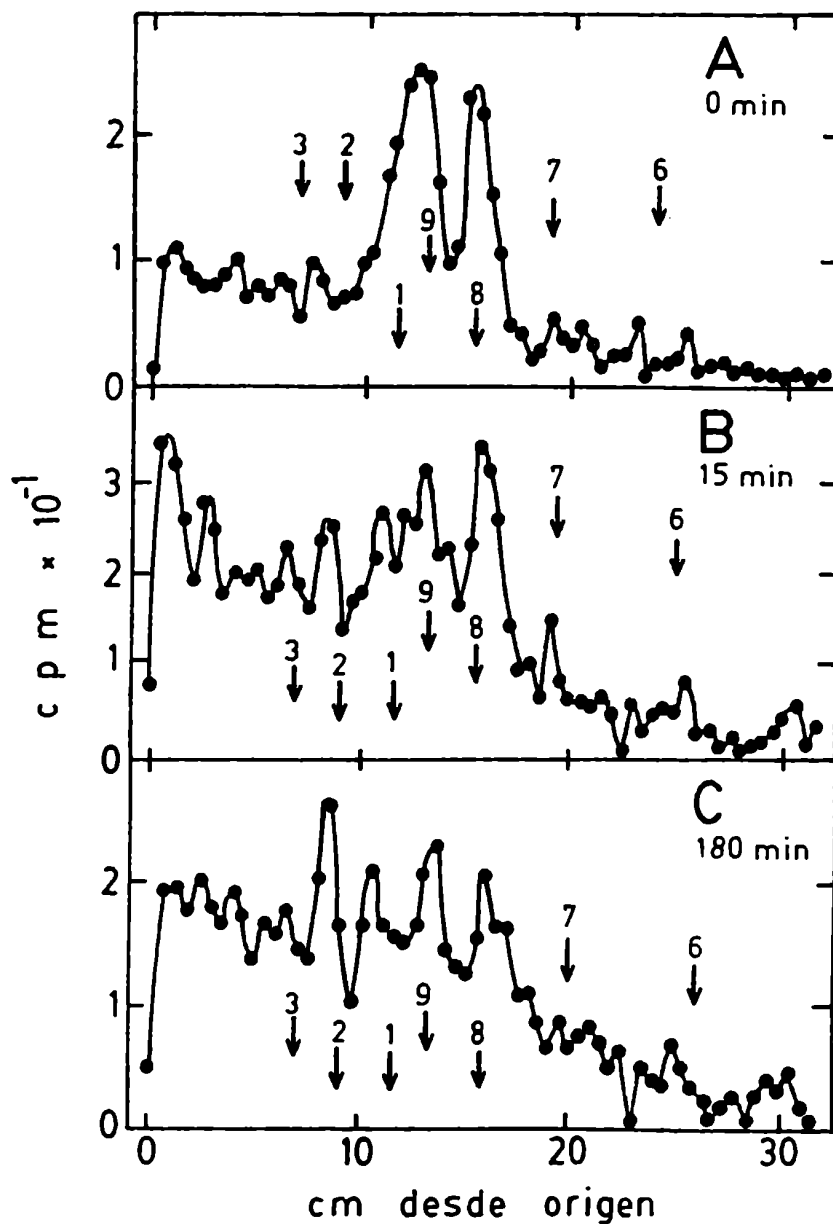


Fig. 63. Marcación con [1,6-<sup>3</sup>H]N-acetilglucosamina y chase. Oligosacáridos separados de proteína con Endo H, aislados de células incubadas con [1,6-<sup>3</sup>H]GlcNAc por 5 min., seguido de chase con medio YPG por los tiempos que se indican en la figura, se cromatografiaron en papel en solvente A. Standards: Como en fig. 44.

## IX. ESTRUCTURAS DE ALGUNOS OLIGOSACARIDOS

### IX.1. OLIGOSACARIDOS MARCADOS A TIEMPOS BREVES DE INCORPORACION:

#### IX.1.a) Man $\alpha$ GlcNAc:

De los compuestos que migraban en cromatografía en papel como Man $\alpha$ GlcNAc provenientes de células incubadas por 5 minutos con [U- $^{14}$ ]glucosa, se tomó el oligosacárido de mayor migración en electroforesis en borato de sodio (fig. 47 A y B). Como vimos (fig. 49), este oligosacárido era degradado con  $\alpha$ -manosidasa dando como productos manosa y un compuesto que migraba como Man $\beta$ -GlcNAc. Para resolver mejor mono y disacáridos, este último fue eluido y cromatografiado en papel con solvente C donde corrió como el disacárido proveniente del tratamiento similar de un oligosacárido de oviducto de gallina.

Por acetólisis (que rompe preferencialmente las uniones  $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6 entre residuos de manosa), se obtuvo un compuesto que migraba como manobiosa y un oligosacárido que migraba menos que manotetraosa (donde migraría Man $\alpha$ GlcNAc) en cromatografía en papel (fig. 64 A). Como se indicó en la sección C.IV.2.c, los alditos sustituidos en la posición 3 no migran en electroforesis en molibdato de sodio; sí lo hacen los sustituidos en otras posiciones. Esto es válido incluso cuando los sustituyentes son manosa o manobiosa $^{14}$ . Por electroforesis en molibdato de sodio de los fragmentos de acetólisis después de reducidos con borohidruro de sodio, la manobiosa se separó en una sustancia que migró y otra que permaneció en el origen, indicando que esta última tenía unión 1 $\rightarrow$ 3 (fig. 65 A). Por análisis de metilación de otra porción de la manobiosa proveniente de acetólisis se obtuvo



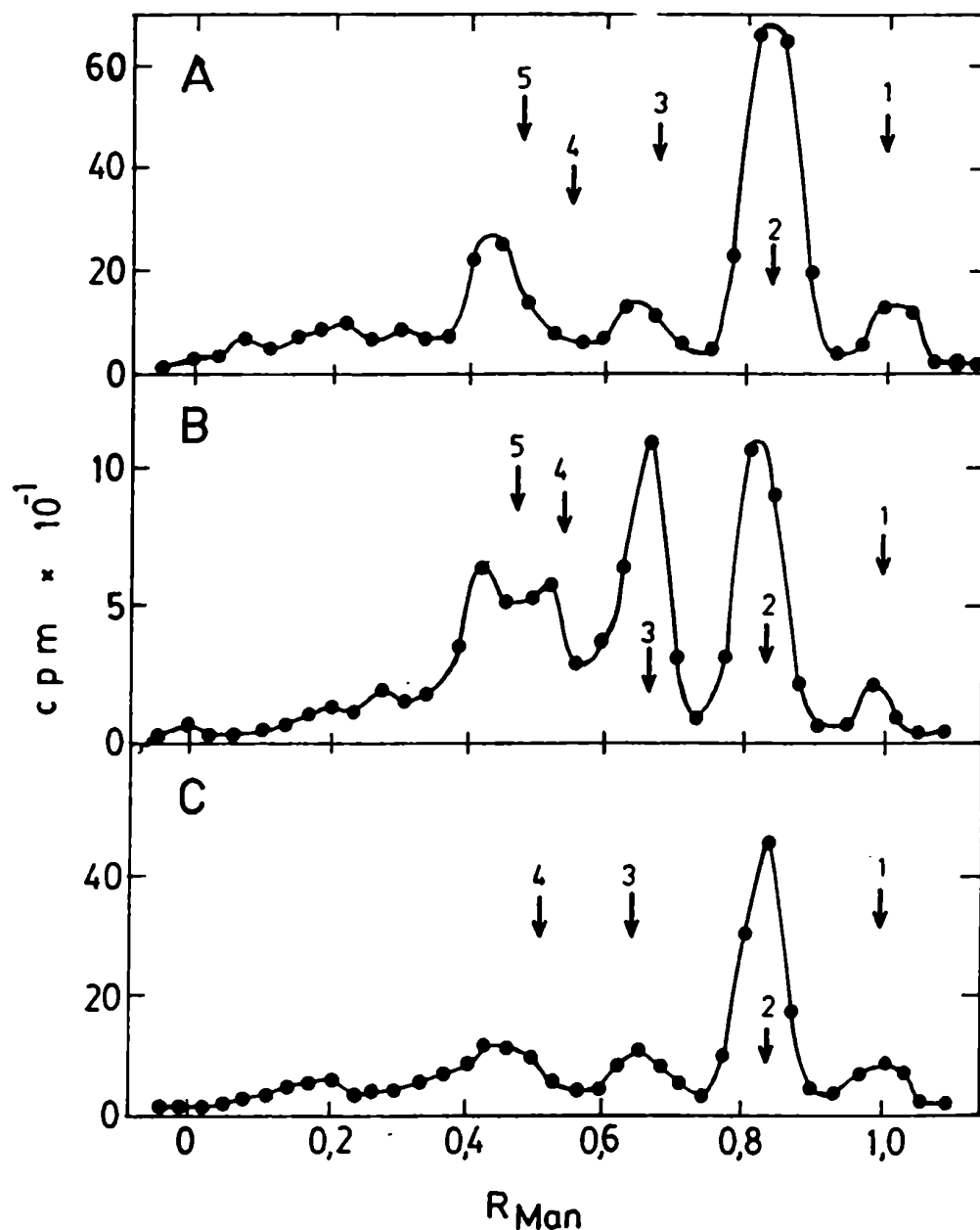


Fig. 64. Acetólisis. Se sometieron a tratamiento de acetólisis oligosacáridos con mayor migración en electroforesis en borato de sodio y que provenían de células incubadas por 5 min. (A y B) y 180 min. (C) con  $[U-^{14}C]$ glucosa. Los oligosacáridos cromatografiaban (fig. 44) como  $Man\alpha GlcNAc$  (A y C) o  $Man\beta GlcNAc$  (B). Se cromatografiaron los productos en solvente B. *Standards*: 1. manosa, 2. manobiosa, 3. manotriosa, 4. manotetraosa.

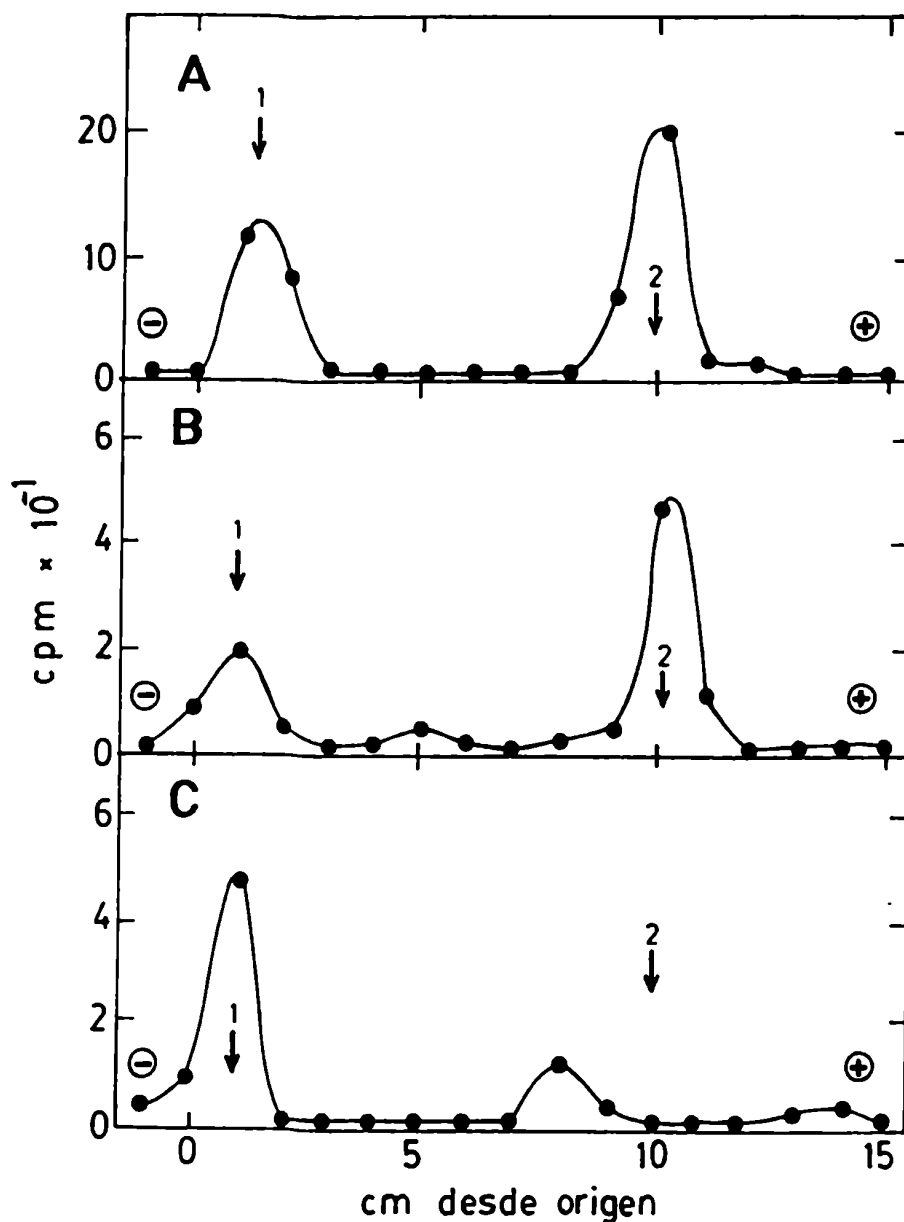


Fig. 65. Electroforesis en molibdato de fragmentos de acetólisis. Los fragmentos obtenidos por acetólisis (fig. 64) se eluyeron, y una parte se redujo con  $\text{NaBH}_4$  y se sometió a electroforesis en papel en molibdato de sodio 0,1 M, pH 5. A. Manobiosa proveniente de Man $\rightarrow$ GlcNAc (fig. 64 A). B. Manobiosa proveniente de Man $\rightarrow$ GlcNAc (fig. 64 B). C. Manotriosa proveniente de Man $\rightarrow$ GlcNAc (fig. 64 B). *Standards:* 1. Man  $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2 Man  $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3 Manol, 2. Man  $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2 Manol.

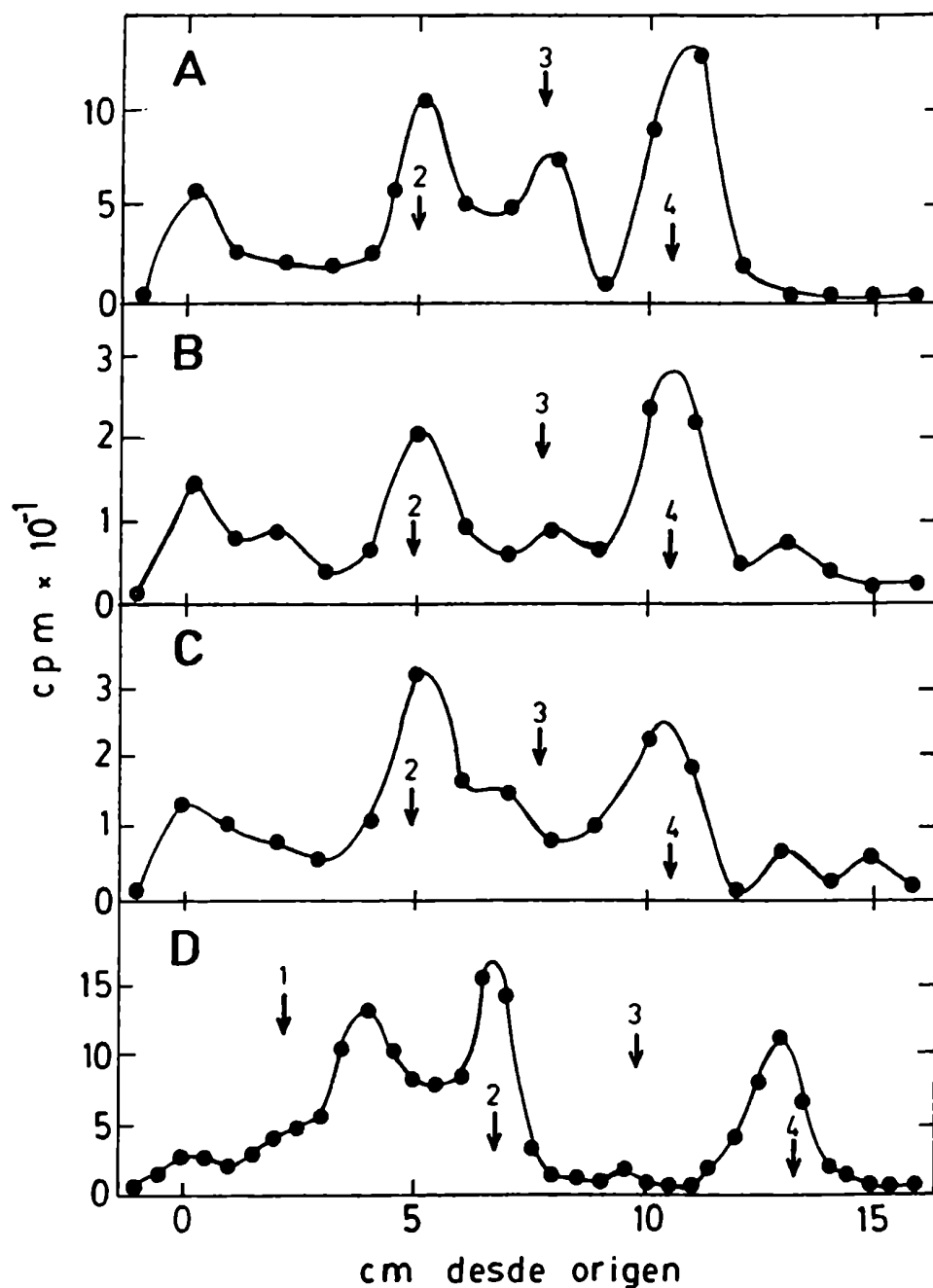


Fig. 66. Análisis de metilación. Los fragmentos de acetólisis de figura 64 se eluyeron y una parte se sometió a permethylación e hidrólisis total. Los productos se cromatografiaron en TLC en solvente H. A. Manobiosa proveniente de  $\text{Man}\alpha\text{GlcNAc}$ . B. Manobiosa proveniente de  $\text{Man}\beta\text{GlcNAc}$ . C. Manotriosa proveniente de  $\text{Man}\beta\text{GlcNAc}$ . D.  $\text{Man}\alpha\text{GlcNAc}$  original; se lo sometió al mismo tratamiento. Standards: 1. 3,4 di-O-MeMan, 2. 3,4,6 tri-O-MeMan, 3. 2,4,6 tri-O-MeMan, 4. 2,4,3,6 tetra-O-MeMan.

3,4,6 tri-O-metilmanosa, 2,4,6 tri-O-metilmanosa y 2,3,4,6 tetra-O-metilmanosa, (fig. 66 A), confirmando así la existencia de 2 disacáridos, uno con unión 1→2 y otro 1→3.

Por análisis de metilación del oligosacárido original se obtuvo 3,4,6 tri-O-metilmanosa, un dimetilado (diferente de 3,4 di-O-metilmanosa) y 2,3,4,6 tetra-O-metilmanosa (fig. 66 D). Esto indicó que todas las manosas monosustituidas en el oligosacárido original lo eran en posición 2, y que los disustituidos no podían serlo en 2 y 6.

Estos resultados, y teniendo en cuenta la especificidad de la Endo H, permiten concluir la estructura de la fig. 67.

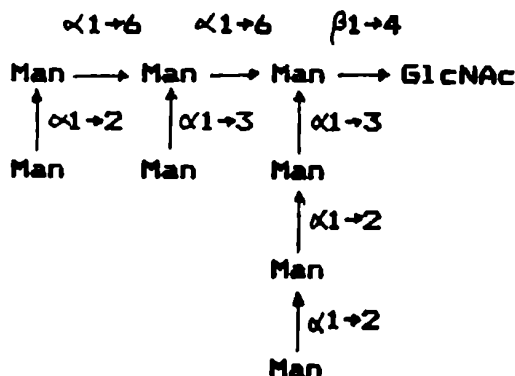


Fig. 67. Estructura del oligosacárido que migró como Man→GlcNAc, totalmente sensible a α-manosidasa, marcado a tiempos breves de incorporación.

#### IX.1.b) Man→GlcNAc:

Se eluyeron los compuestos que migraban como Man→GlcNAc provenientes de células de micelio incubadas por 5 minutos con glucosa[U-<sup>14</sup>C] (fig. 44 A). Se separaron por electroforesis en borato tomándose el oligosacárido de mayor migración.

Por tratamiento con  $\alpha$ -manosidasa el oligosacárido se degradó a manosa y el disacárido  $\text{Man}\beta\text{-GlcNAc}$ .

Como veremos a continuación, los estudios estructurales indicaron que estábamos en presencia de una mezcla de isómeros con la composición  $\text{Man}\rightarrow\text{GlcNAc}$ . Veremos ahora los resultados que permitieron descubrir la estructura del principal de dichos isómeros.

Por acetólisis se obtuvieron en este caso compuestos que migraban como manobiosa, manotriosa, y un oligosacárido que migraba menos que manotetraosa (donde migraría  $\text{Man}\rightarrow\text{GlcNAc}$ ) (fig. 64 B). Reducidos estos fragmentos y sometidos a electroforesis, la manobiosa migró en su mayor parte, indicando baja proporción del disacárido  $\text{Man}\alpha 1\rightarrow 3 \text{ Man}$  (fig. 65 B). La manotriosa no migró, indicando una unión  $1\rightarrow 3$  al residuo del extremo reductor (fig. 65 C).

Por análisis de metilación de los fragmentos de acetólisis se obtuvo para la manobiosa 3,4,6 tri-O-metilmanosa, algo de 2,4,6 tri-O-metilmanosa y 2,3,4,6 tetra-O-metilmanosa y para la manotriosa 3,4,6 tri-O-metilmanosa, un hombro que podría incluir 2,4,6 tri-O-metilmanosa y 2,3,4,6 tetra-O-metilmanosa (fig. 66 B y C). Esto, junto con el resultado de la electroforesis en molibdato indica que las estructuras del disacárido y trisacárido principales son:  $\text{Man } 1\rightarrow 2 \text{ Man}$  y  $\text{Man } 1\rightarrow 2 \text{ Man } 1\rightarrow 3 \text{ Man}$ . En este último caso, por permetilación e hidrólisis se deberían haber obtenido cantidades iguales de 3,4,6 y 2,4,6 tri-O-metilmanosa, pero en las condiciones alcalinas de la reacción ocurre una degradación parcial de la manosa del extremo reductor, en este caso la que tiene la sustitución en posición 3.

Estos resultados y teniendo en cuenta la especificidad de la Endo H, permiten deducir la estructura de la fig. 68 para el principal oligosacárido de fórmula  $\text{Man}\rightarrow\text{GlcNAc}$ :

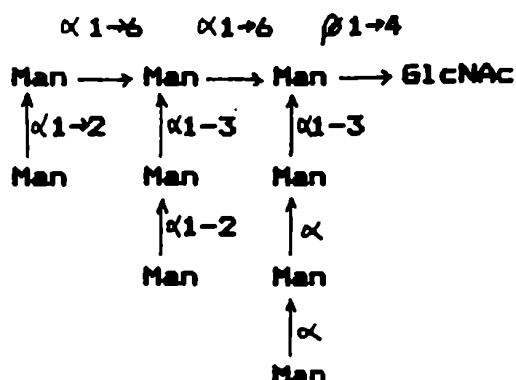


Fig. 68. Estructura del principal oligosacárido que migró como Man→GlcNAc, totalmente sensible a  $\alpha$ -manosidasa, marcado a tiempos breves de incorporación.

Tanto la estructura de este oligosacárido como la de Man→GlcNAc son idénticas a las de algunos intermediarios en el procesamiento de oligosacáridos con unión N-glicosídica de mamíferos <sup>135</sup>.

## IX.2. OLIGOSACARIDOS MARCADOS A TIEMPOS LARGOS DE INCORPORACION:

### IX.2.a) Man→GlcNAc:

Se eluyeron los compuestos que migraban en cromatografía en papel como Man→GlcNAc, provenientes de células de la forma micelar incubadas por 180 minutos con glucosa[U-<sup>14</sup>C] (fig. 44 D). Se sometieron a electroforesis en borato de sodio, obteniéndose tres sustancias, igual que con los oligosacáridos provenientes de células marcadas por 5 minutos (fig. 47 A), en orden de migración creciente: A, E, C (fig. 69):

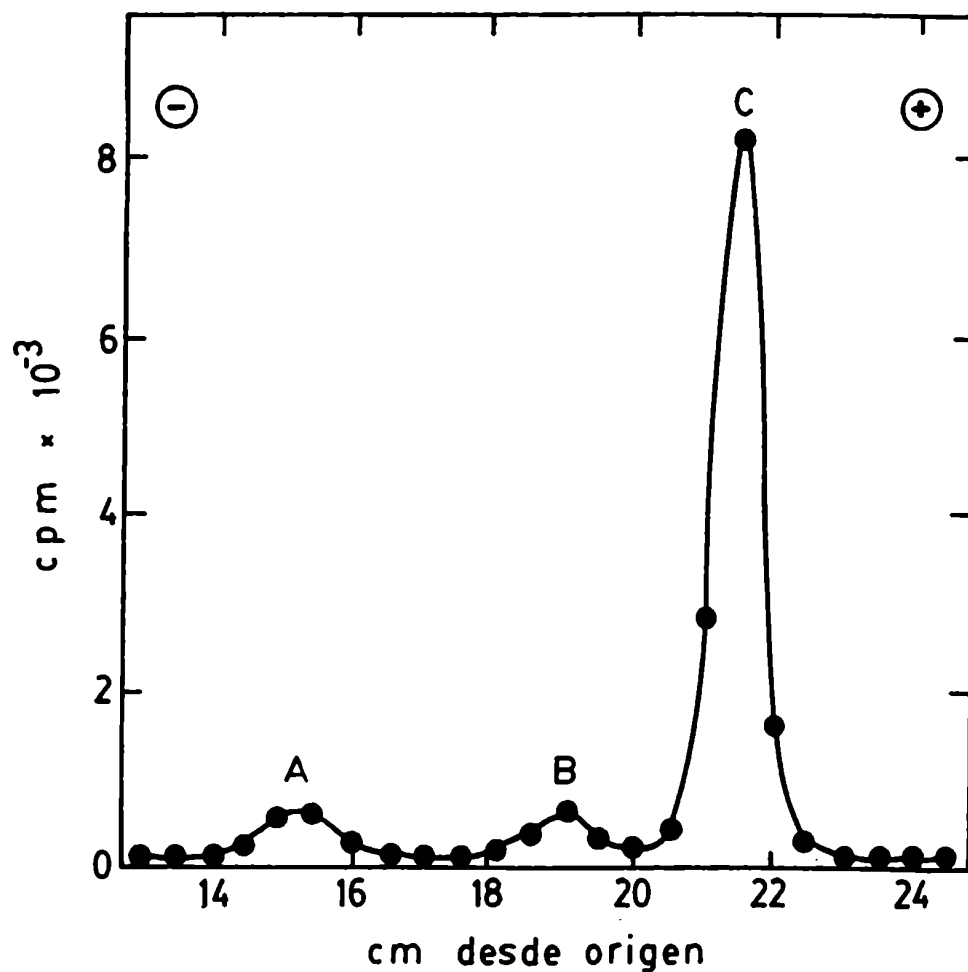


Fig. 69. Electroforesis en borato de sodio. Oligosacaridos que migraban en cromatografia en papel como  $\text{Man}\alpha\text{GlcNAc}$  provenientes de celulas incubadas con  $[\text{U}-^{14}\text{C}]\text{glucosa}$  por 180 min. (fig. 44 D) fueron eluidos y sometidos a electroforesis en papel en buffer tetraborato de sodio 50 mM, pH 9,5.

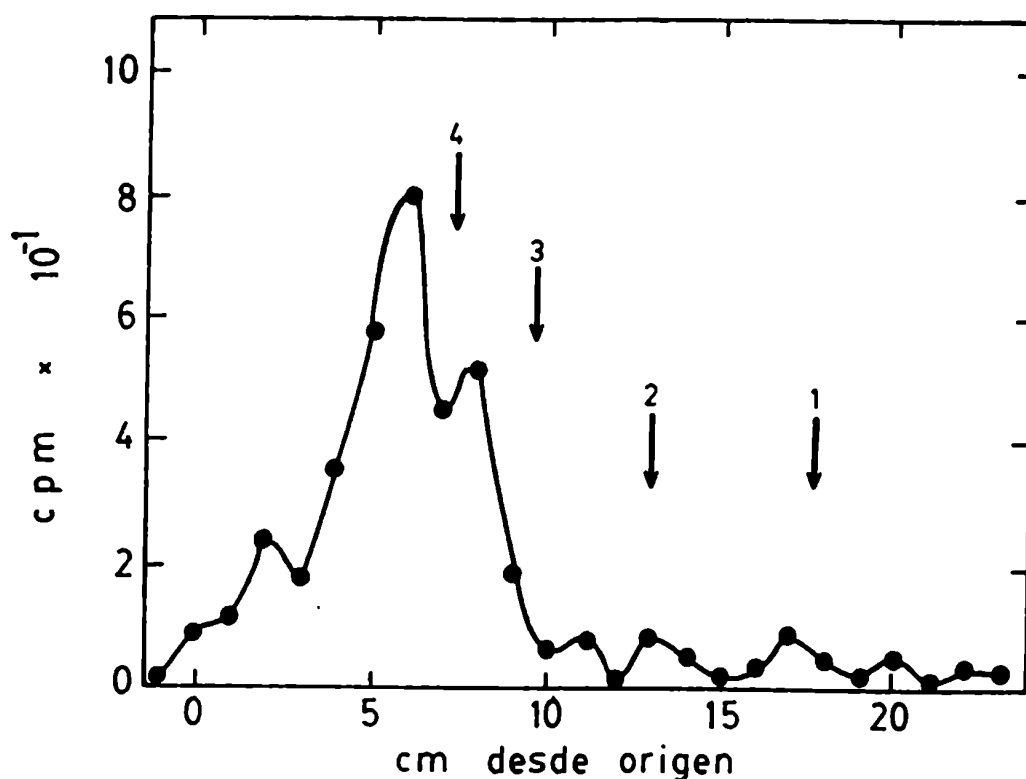


Fig. 70. Tratamiento exhaustivo con  $\alpha$ -manosidasa de un oligosacárido parcialmente resistente a la enzima. El oligosacárido B de la figura 69 fue eluido y tratado con  $\alpha$ -manosidasa. Se cromatografió entonces en papel y los productos resistentes se eluyeron y volvieron a tratar con la enzima. Los productos se cromatografiaron en papel en solvente B. *Standards:* 1. manosa, 2. manobiosa, 3. manotriosa, 4. manotetraosa.



- A: Se mostró totalmente resistente a  $\alpha$ -manosidasa. Por hidrólisis total se obtuvo manosa, 3-O-metilmanosa y glucosamina.
- B: Por tratamiento con  $\alpha$ -manosidasa se obtuvo una degradación parcial, similar a la obtenida para el oligosacárido marcado en células incubadas por 5 minutos (fig. 49 B). Los fragmentos resistentes fueron eluidos y tratados nuevamente con  $\alpha$ -manosidasa para asegurar un tratamiento exhaustivo. Como se ve en la figura 70, no se liberó más manosa y los productos obtenidos migraron como manotetraosa y como varios oligosacáridos más grandes.
- C: Por tratamiento con  $\alpha$ -manosidasa se obtuvo manosa y un oligosacárido que migraba como  $\text{Man}^{\beta}\text{-GlcNAc}$ , como en el caso de  $\text{Man}^{\beta}\text{-GlcNAc}$  de células incubadas por 5 minutos. El producto de la degradación enzimática se eluyó y cromatografió en papel en solvente C, migrando como el disacárido obtenido de oviducto de gallina. Por acetólisis del oligosacárido C, el producto principal obtenido fue manobiosa (fig. 64 C), lo que podría significar que el oligosacárido proveniente de la transferencia a partir de  $\text{Dol-P-P}$  se procesó, agregando luego residuos de manosa. Una estructura final que explique estos resultados podría ser la de la fig. 71:

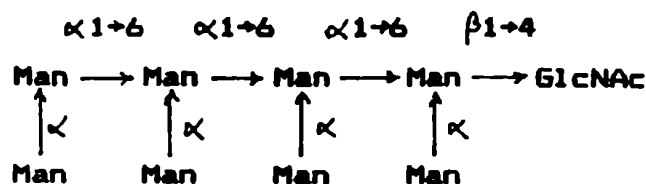


Fig. 71. Una de las estructuras posibles del oligosacárido que migró como  $\text{Man}^{\beta}\text{-GlcNAc}$  totalmente sensible a  $\alpha$ -manosidasa, marcado a tiempos largos de incorporación.

Sin embargo, como por acetólisis se pierde a veces parte

del compuesto  $\text{Man}_4\text{GlcNAc}$ , es posible que este oligosacárido fuera similar al marcado en 5 minutos de incubación (fig. 67).

#### IX.2.b) $\text{Man}_{12}\text{GlcNAc}$ :

Oligosacáridos provenientes de células de la forma micelar incubadas por 180 minutos con glucosa[ $\text{U-}^{14}\text{C}$ ] que migraron en cromatografía en papel como  $\text{Man}_{12}\text{GlcNAc}$  (fig. 44 D) fueron sometidos a electroforesis en borato de sodio obteniéndose tres sustancias, en orden de migración creciente: A, B, C (fig. 72(1)).

A: Fue totalmente resistente a  $\alpha$ -manosidasa (fig. 73 A). Por hidrólisis total dio manosa, 3-O-metilmanosa y glucosamina.

B: Por tratamiento con  $\alpha$ -manosidasa dio un compuesto de mayor migración que el original (fig. 73 B). Éste, eluido y corrido en HPLC en columna Lichrosorb  $\text{NH}_2$  con solvente D migró entre  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$  y  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$ . Por acetólisis se obtuvo algo de maniobiosa y principalmente oligosacáridos grandes (fig. 74 A). Esto indicaría que la mayor parte del oligosacárido no tiene uniones 1 $\rightarrow$ 6.

C: Este oligosacárido fue totalmente sensible a  $\alpha$ -manosidasa (fig. 73 C). Por acetólisis se obtuvo una proporción importante de maniobiosa y oligosacáridos grandes, pero no de manotriosa (fig. 74 B). Como en B los oligosacáridos grandes indicarían que una parte grande del oligosacárido no tiene uniones 1 $\rightarrow$ 6.

Las estructuras generales de la fig. 75 serían una de las posibilidades que explican los resultados obtenidos:

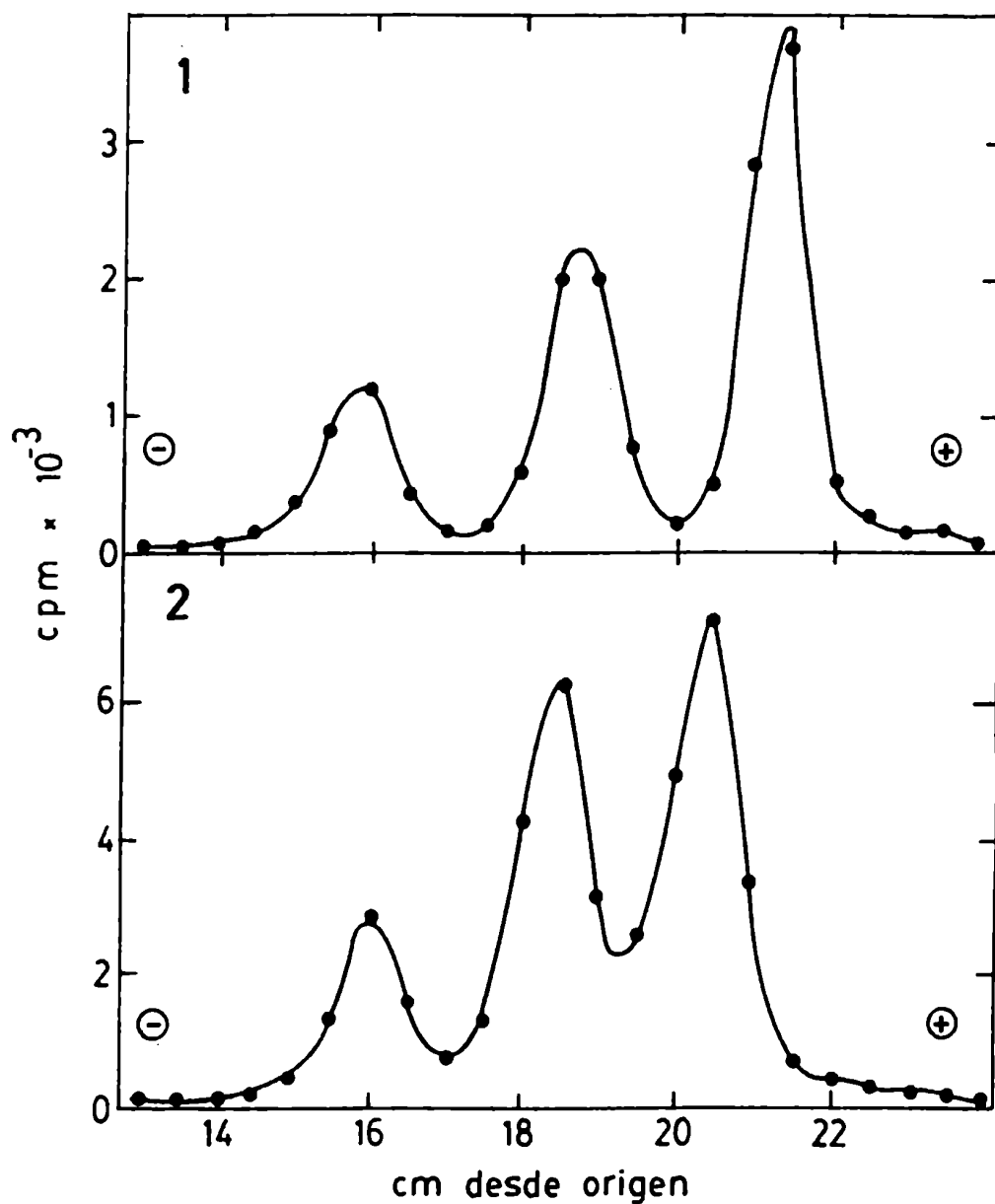


Fig. 72. Electroforesis en borato de sodio. Oligosacáridos que migraban en cromatografía en papel como Man<sub>1</sub>2GlcNAc (1) o grandes (2) (cm 0-2 de fig. 44 D), provenientes de células incubadas con [U-<sup>14</sup>C]glucosa por 180 min. fueron eluidos y sometidos a electroforesis en papel en buffer borato de sodio 50 mM, pH 9,5.

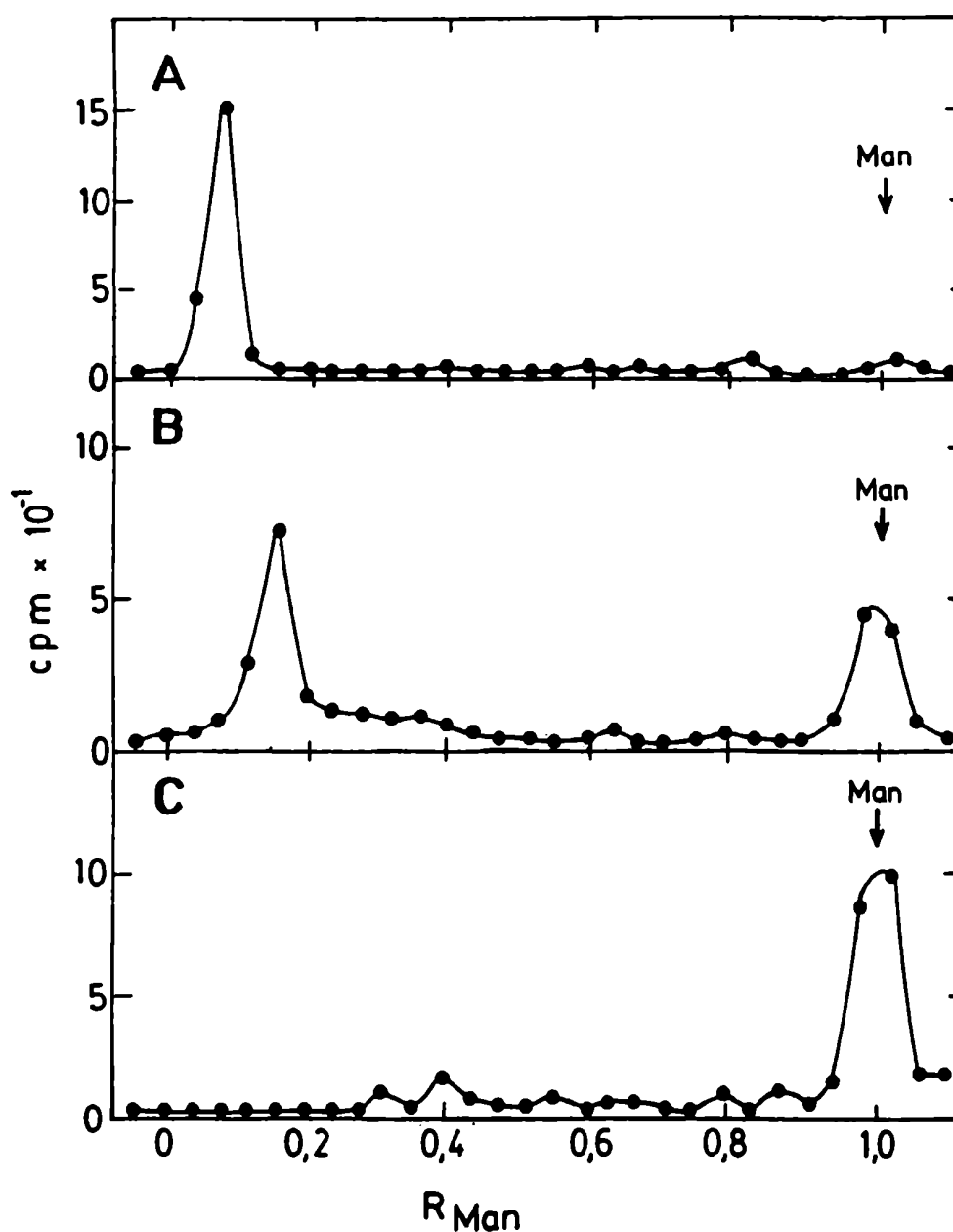


Fig. 73. Tratamiento con  $\alpha$ -manosidasa. Los oligosacáridos de la fig. 72 (1) fueron eluidos y una parte fue tratada exhaustivamente con  $\alpha$ -manosidasa. Los productos provenientes del oligosacárido de menor migración en electroforesis en borato (A), intermedia (B), y mayor (C) se cromatografiaron en papel en solvente B.

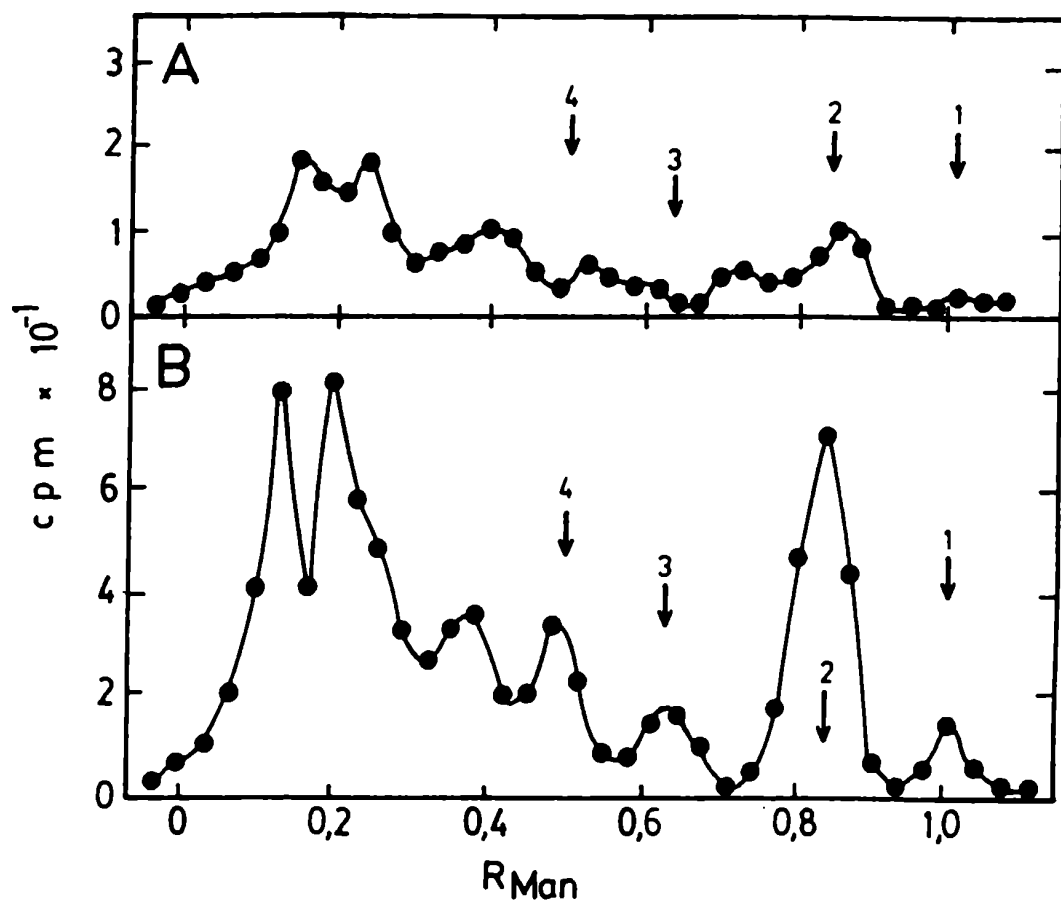


Fig. 74. Acetólisis. Los oligosacáridos de la figura 72 (1) fueron eluidos y una parte fue sometida a acetólisis. Los productos obtenidos a partir del oligosacárido de migración intermedia en electroforesis en borato (A) y del de mayor migración (B) se cromatografiaron en papel en solvente B. *Standards:* 1. manosa, 2. manobiosa, 3. manotriosa, 4. manotetraosa.

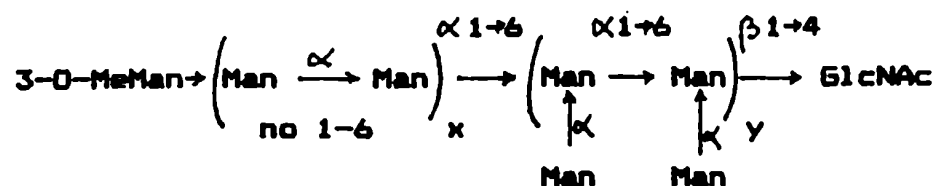
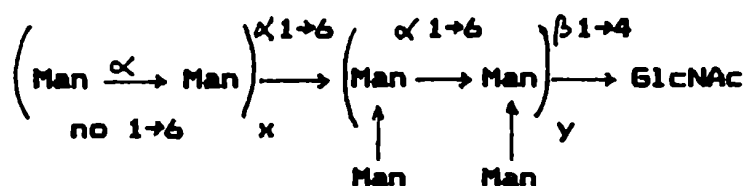
Man<sub>1-2</sub>GlcNAc BMan<sub>1-2</sub>GlcNAc C

Fig. 75. Estructuras posibles de oligosacáridos que migraron como Man<sub>1-2</sub>GlcNAc, parcial (B) o totalmente (C) sensibles a  $\alpha$ -manosidasa, marcados a tiempos largos de incorporación.

Oligosacáridos grandes:

También de células de la forma micelar incubadas por 180 minutos con glucosa[U-<sup>14</sup>C] se tomaron oligosacáridos que no migraron en cromatografía en papel (fig. 44 D - cm 0-2). Una vez separadas por electroforesis en borato se estudiaron los oligosacáridos A, B y C (fig. 72(2)):

A: Totalmente resistente a  $\alpha$ -manosidasa (fig. 50 A). Resultó también casi totalmente resistente a acetólisis (fig. 76 A). Por análisis de metilación se obtuvo principalmente 3,4,6 tri-O-metilmanosa y muy baja proporción de 2,3,4,6 tetra-O-metilmanosa, lo que indicaría baja ramifica-

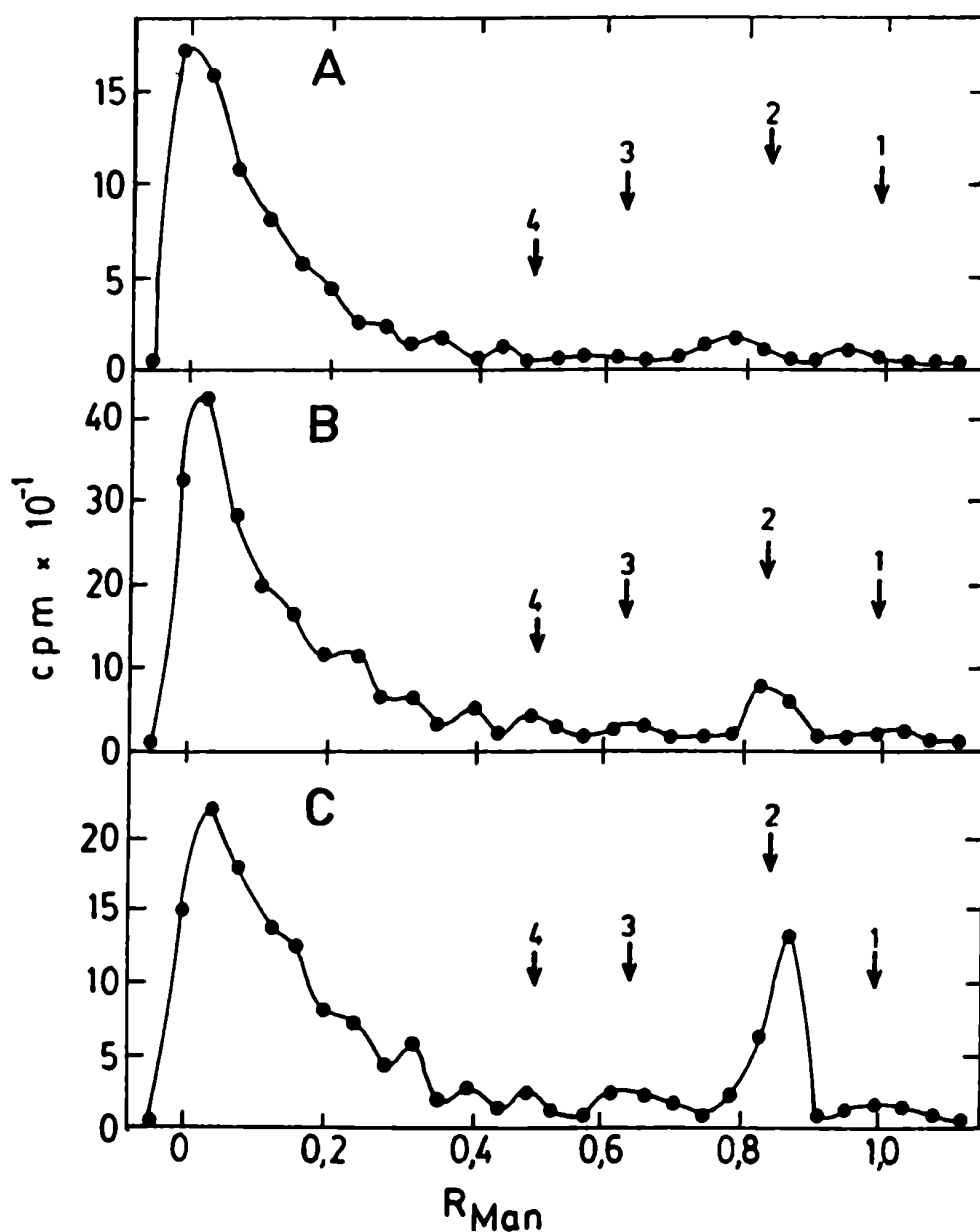


Fig. 76. Acetólisis de oligosacáridos grandes. Los oligosacáridos de la figura 72 (2) fueron eluidos y una parte fue sometida a acetólisis. Los productos obtenidos a partir del oligosacárido de migración menor (A), intermedia (B) y mayor (C) se cromatografiaron en papel en solvente B. *Standards*: 1. manosa, 2. manobiosa, 3. manotriosa, 4. manotetraosa.

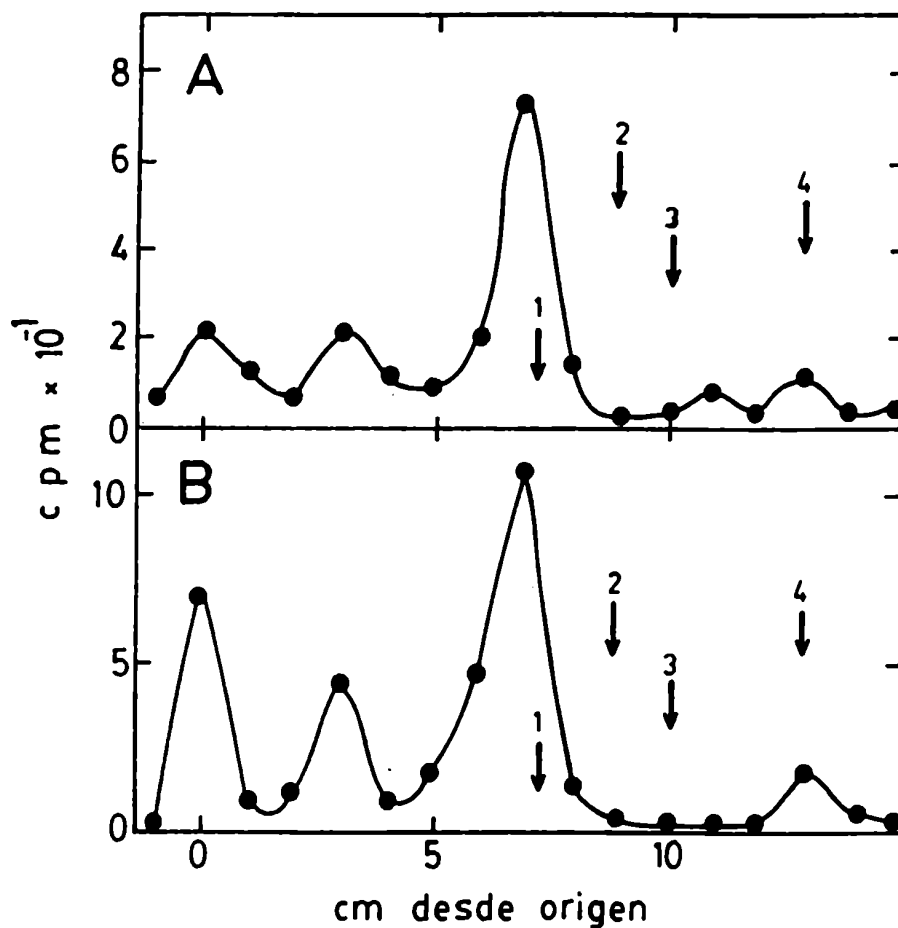


Fig. 77. Análisis de metilación - Oligosacáridos grandes. Los oligosacáridos de la figura 72 (2) fueron eluidos y una parte fue sometida a permetilación e hidrólisis total. Los productos se cromatografiaron en TLC en solvente H. A. Oligosacárido de menor migración en electrofóresis en borato. B. Oligosacárido de migración intermedia. Standards: 1. 3,4,6 tri-O-MeMan, 2. 2,3,4 tri-O-MeMan, 3. 2,4,6 tri-O-MeMan, 4. 2,3,4,6 tetra-O-MeMan.

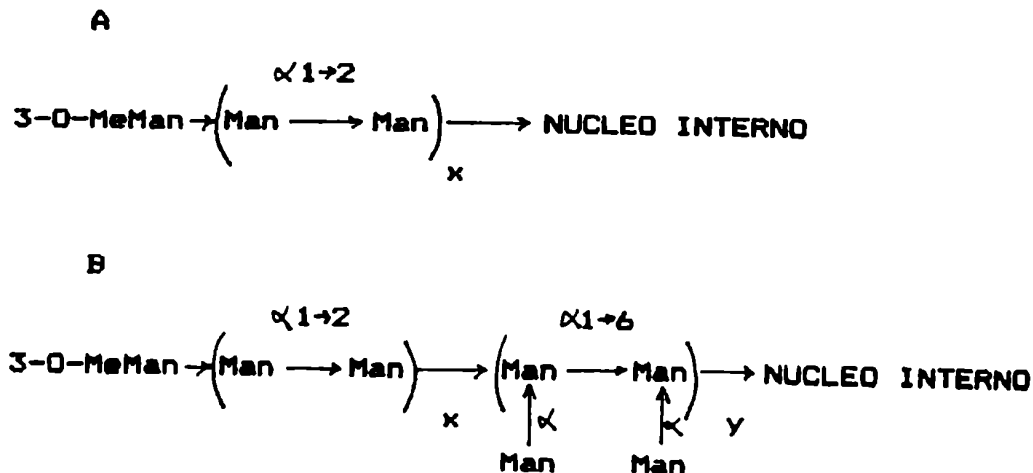


ción (fig. 77 A), aunque la proporción apreciable de mono- y dimetilados podría indicar permetilación incompleta. Como se dijo en la sección C.VII.2 oligosacáridos marcados a partir de [metil- $^{14}\text{C}$ ]metionina de tamaño grande dieron por análisis de metilación solo 2,3,4,6 tetra-O-metilmanosa radioactiva, indicando que 3-O-metilmanosa sólo se encontraba en los extremos no reductores (fig. 62).

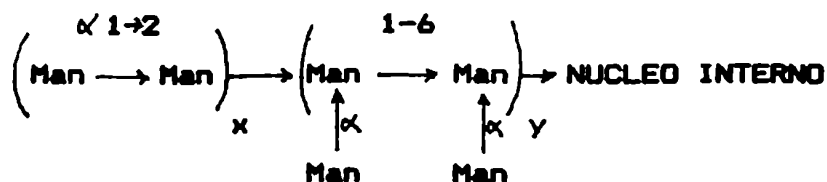
- B: Por tratamiento con  $\alpha$ -manosidasa liberó manosa pero sin reducirse mucho de tamaño (fig. 50 B). Por acetólisis liberó algo de manobiosa (fig. 76 B). Por análisis de metilación se obtuvo un resultado similar al oligosacárido A (fig. 77 B).
- C: Totalmente degradado por  $\alpha$ -manosidasa (fig. 50 C). Por acetólisis se libera una proporción apreciable de manobiosa (fig. 76 C).

Una posible explicación de los resultados obtenidos la podrían dar las estructuras generales de la fig. 78:

Fig. 78. Estructuras posibles de oligosacáridos grandes: totalmente resistente a  $\alpha$ -manosidasa (A), parcialmente (B) o totalmente sensible (C), marcados a tiempos largos de incorporación.



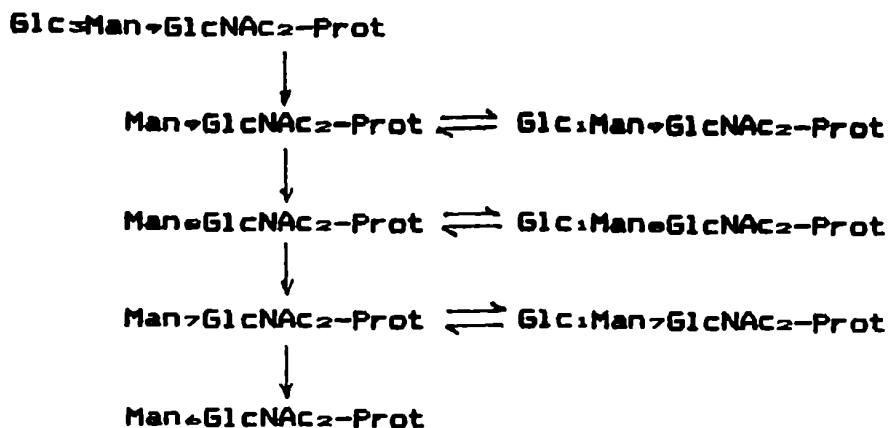
C



**NOTA:** Las estructuras para oligosacáridos marcados a tiempos largos de incorporación (fig. 71, 75 y 78) se incluyeron a modo de ilustración para explicar los resultados obtenidos, pero de ninguna manera significan resultados definitivos.

#### X. GLUCOSILACION TRANSITORIA:

Así como se determinó recientemente en protozoarios, plantas y mamíferos<sup>142, 144, 145</sup> (detallado en la sección A.III. 2.a.v. de la Introducción), se quiso investigar si ocurría glucosilación transitoria de oligosacaridos unidos a proteína en *M.rouxii*, especialmente ante el hecho de no haberse encontrado evidencias de este mecanismo en *S.cerevisiae*<sup>142</sup>. Recordemos el mecanismo verificado en mamíferos:



MARCACION Y CHASE DE OLIGOSACARIDOS IN VIVO CON  
[U-<sup>14</sup>C]GLUCOSA:

Se incubaron células de la forma micelar de *M.rouxii* con [U-<sup>14</sup>C]glucosa durante 3 minutos tras lo cual se sometieron a un chase con medio con glucosa por los tiempos indicados en la figura 79. Se trataron las proteínas totales con una proteasa. Los glicopéptidos se trataron entonces con Endo H y los oligosacáridos resultantes se corrieron en cromatografía en papel en solvente A. En el caso de que existiera el mecanismo de glucosilación transitoria se esperaba obtener a tiempos cortos los oligosacáridos Glc:Man $\rightarrow$ GlcNAc, Glc:Man $\leftrightarrow$ GlcNAc y Glc:Man $\rightarrow$ GlcNAc <sup>1+2</sup>. Como vemos en la figura 79 incluso a tiempos breves sólo se observan oligosacáridos que migran como standards de la serie Man $\leftrightarrow$ GlcNAc. Se eluyeron entonces las zonas correspondientes a los valles donde hipotéticamente hubieran migrado los oligosacáridos glucosilados (indicados con barras en la fig. 79). Estos compuestos eluidos fueron tratados con  $\alpha$ -manosidasa obteniendose oligosacáridos que migraron en cromatografía en papel como standards de Glc:Man $\rightarrow$ GlcNAc y Glc:Man $\leftrightarrow$ GlcNAc (fig. 80, 0 min., A, B y C). (Con Glc:Man $\rightarrow$  $\rightarrow$ GlcNAc provenientes de tiroides vacuno se comprobó que la degradación a Glc:Man $\rightarrow$ GlcNAc era incompleta por efecto protector a distancia de la glucosa). Esto se cumplió para los oligosacáridos provenientes de células incubadas durante 3 minutos con [U-<sup>14</sup>C]glucosa. Pero luego de 15 ó 150 minutos de chase se obtuvieron también oligosacáridos resistentes a  $\alpha$ -manosidasa que migraron con R<sub>man</sub> mayor. Sometidos estos oligosacáridos a hidrólisis ácida total se obtuvo para la marcación de 3 minutos manosa y glucosa, siendo la proporción de marca en glucosa mayor para Glc:Man $\rightarrow$ GlcNAc que para Glc:Man $\rightarrow$ GlcNAc

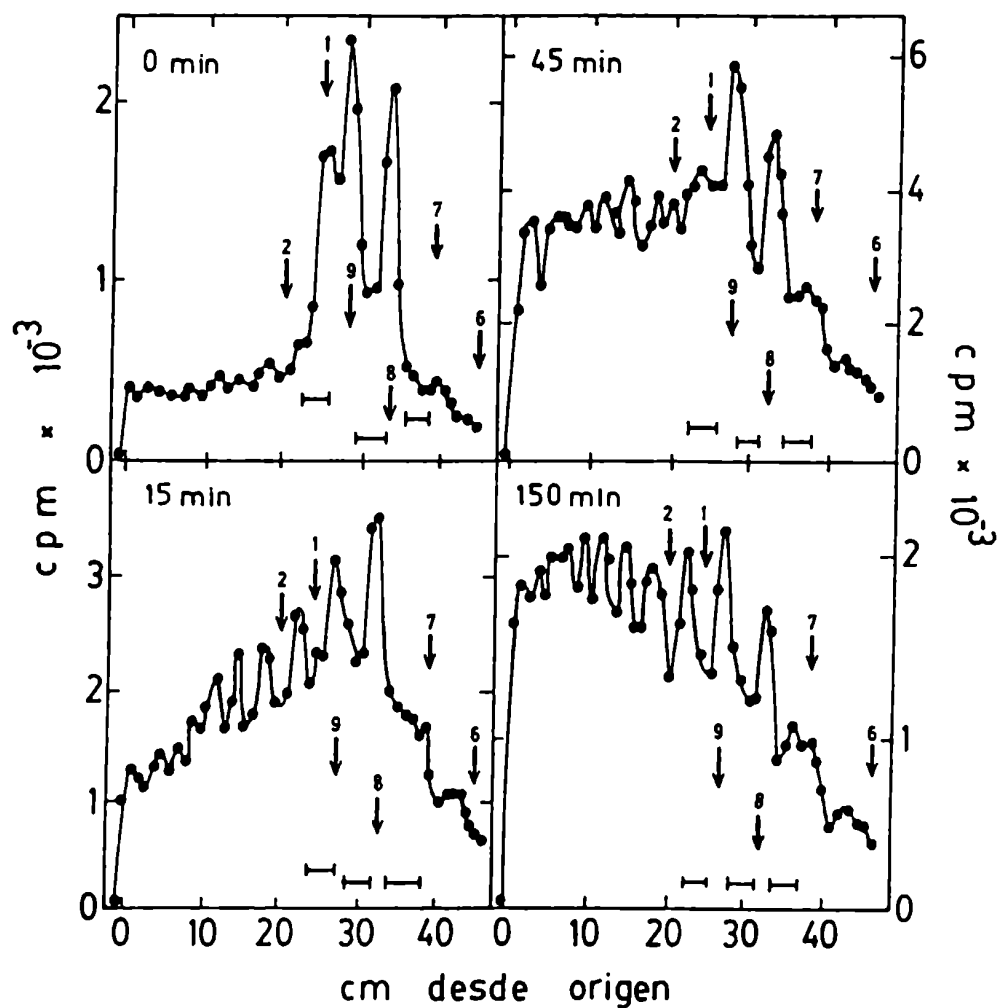


Fig. 79. Marcación y *chase in vivo* con [U-<sup>14</sup>C]glucosa. Células de la forma micelio fueron incubadas con [U-<sup>14</sup>C]glucosa por 3 min., tras lo cual se lavaron y se realizó un *chase* con medio YPG (2% de glucosa), por los tiempos indicados en la figura. Se aislaron los oligosacáridos con unión N-glicosídica como fue descrito y se cromatografiaron en papel en solvente A. *Standards*: Como en fig. 44.

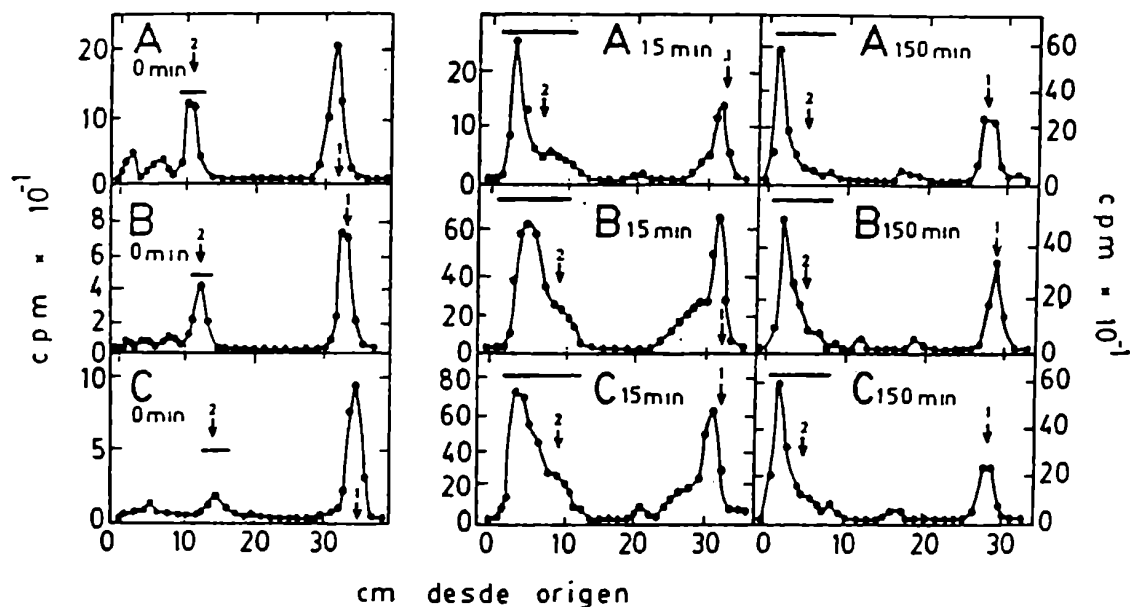


Fig. 80. Tratamiento con  $\alpha$ -manosidasa. Las zonas de la cromatografía en papel ilustrada en la fig. 79 que corresponden a los valles donde deberían haber migrado Glc:Man $\rightarrow$ GlcNAc (A), Glc:Man $\rightarrow$ GlcNAc (B), y Glc:Man $\rightarrow$ GlcNAc (C), (barras en fig. 79), fueron eluidas, los compuestos eluidos tratados con  $\alpha$ -manosidasa y los productos cromatografiados en papel en solvente B. 0, 15 y 150 min. corresponden a los tiempos de chase a que se sometieron las células de donde provienen los oligosacáridos. Standards: 1. Man, 2. Glc:Man $\rightarrow$ GlcNAc + Glc:Man $\rightarrow$ GlcNAc.

(fig. 81, 0 min., A, B y C). En cambio luego de sólo 15 minutos de *chase* casi desapareció completamente la glucosa marcada, indicando un proceso de de-glucosilación (fig. 81, 15 min., A, B y C). La resistencia a  $\alpha$ -manosidasa de los oligosacáridos provenientes de 15 ó 150 minutos de *chase* (fig. 80, 15 y 150 min., A, B y C) era por lo tanto debida a los residuos de 3-O-metilmanosa.

Se quiso verificar que oligosacáridos grandes no eran glucosilados. Se eluyeron los correspondientes a los cm 3 a 9 de la figura 79. Estos fueron tratados con  $\alpha$ -manosidasa y los productos resistentes a la enzima se sometieron a hidrólisis total. Como se ve en la figura 82, no se observó glucosa ni antes ni después del *chase*.

Se debe señalar que el proceso de glucosilación-deglucosilación es mucho más rápido en *Mucor rouxii* que en otras células, ya que luego de 15 minutos de *chase* desaparecieron casi por completo los compuestos glucosilados. Por ejemplo en *T. cruzi*, luego de 120 minutos de *chase* todavía quedaba una proporción considerable de Glc:Man+GlcNAc 144.

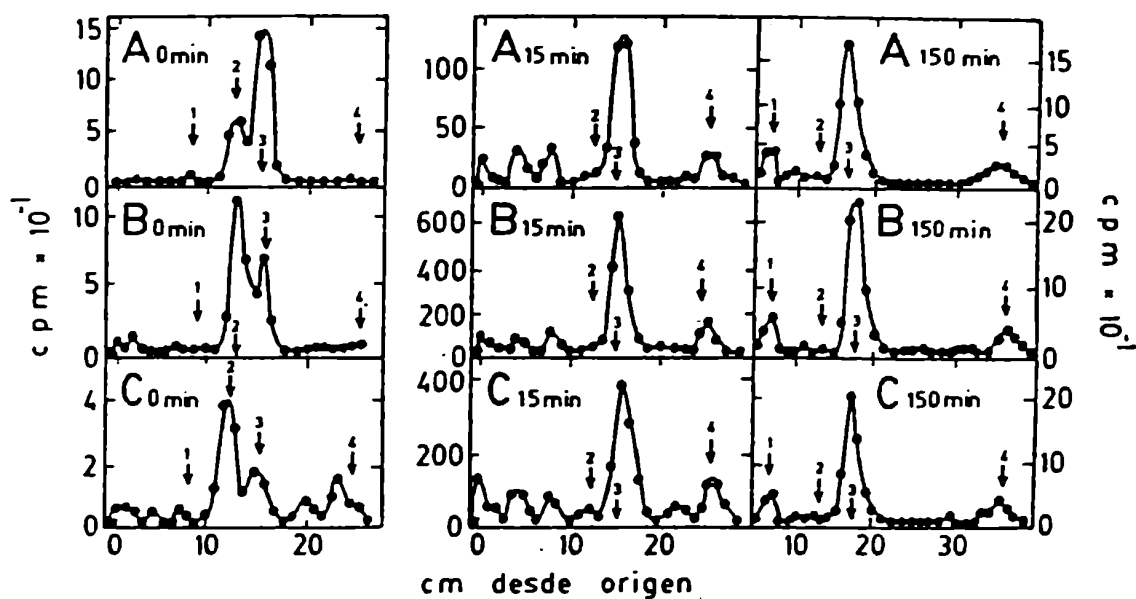


Fig. 81. Hidrólisis total de oligosacáridos resistentes a  $\alpha$ -manosidasa. Los oligosacáridos resistentes a  $\alpha$ -manosidasa de la fig. 80 (barras) fueron eluidos y sometidos a hidrólisis ácida total (HCl 1 N por 4 hs. a 100 C). Se cromatografiaron los productos en papel, en solvente C para los productos provenientes de células incubadas con 0 y 15 min. de *chase* y solvente D para los de 150 min. de *chase*. A, B, C, y tiempos como en fig. 80. *Standards*: 1. GlcNH<sub>2</sub>, 2. Glc, 3. Man, 4. 3-O-MeGlc.

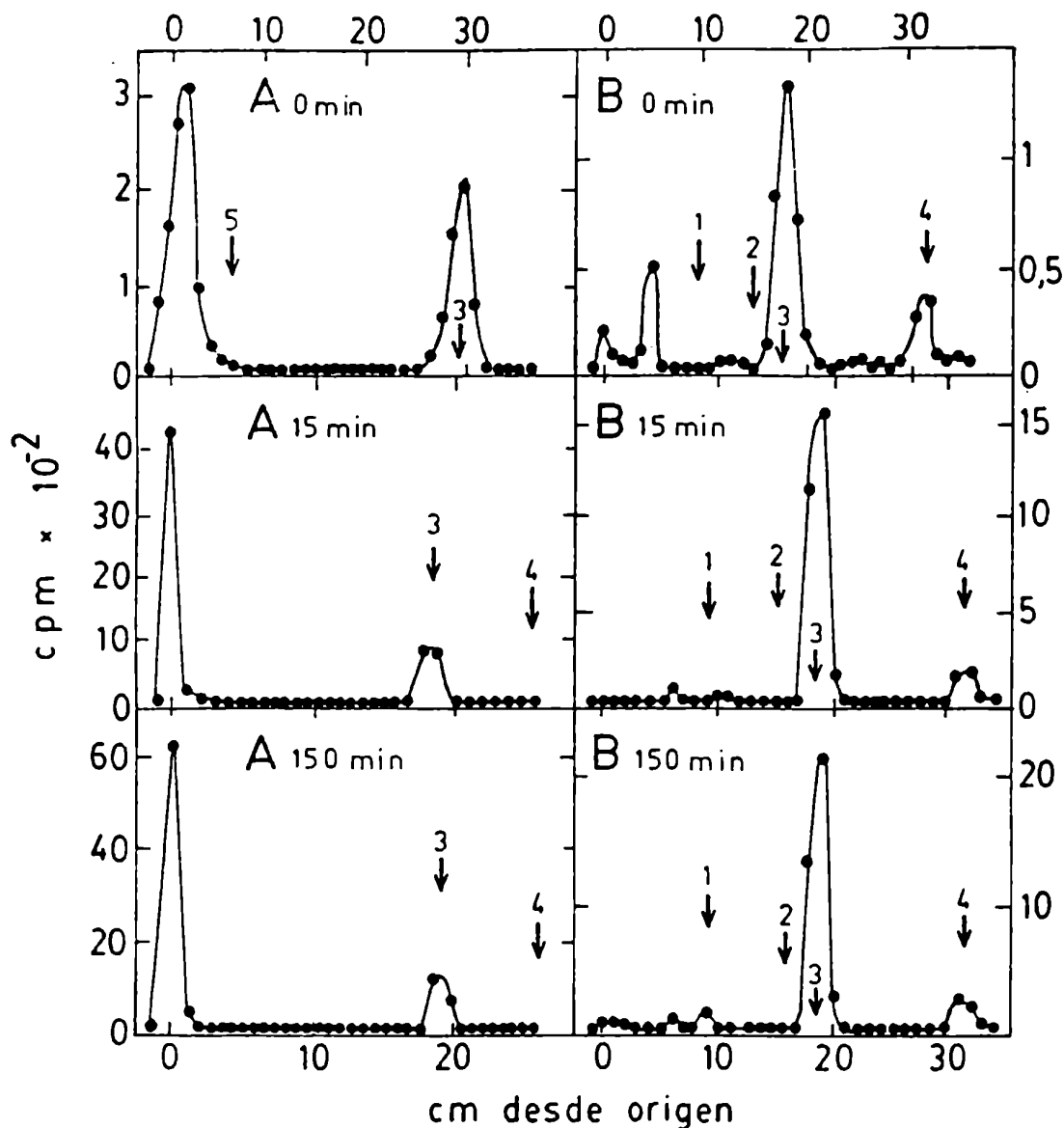


Fig. B2. *Chase* de oligosacáridos grandes. A. Oligosacari-  
dos grandes (cm 3 a 9 del cromatograma ilustrado en fig. 79)  
fueron eluidos y tratados con  $\alpha$ -manosidasa. Se cromatografiaron  
los productos en papel en solvente B. B. Los compuestos  
resistentes a  $\alpha$ -manosidasa se eluyeron y sometieron a hidrólisis  
ácida total, cromatografiando los productos en papel en solvente  
D. 0, 15 y 150 min.: tiempo de *chase* luego de 3 min. de  
pulso de  $[U-^{14}C]$ glucosa. *Standards*: Como en fig. B1. 5.  
Glc, Man, GlcNAc.





DISCUSSION  
Y  
CONCLUSIONES

•

•

•

•

•

La síntesis de oligosacáridos unidos a asparagina de glicoproteínas incluye tres etapas principales: 1) La síntesis de monosacáridos unidos a dolicol por puentes fosfato; 2) La transferencia de los azúcares de estos derivados a un oligosacárido unido a dolicol por unión pirofosfato. Algunos de los residuos de manosa se transfieren directamente a este oligosacárido a partir de GDPMan. Igualmente los residuos de N-acetilglucosamina se transfieren directamente a partir de UDPGlcNAc. 3) La transferencia del oligosacárido de dolicol-P-P a proteína y su posterior procesamiento. Analizaremos los tres procesos en *Mucor rouxii*.

#### I. DOLICOL-P-MONOSACARIDOS:

La síntesis de monosacáridos unidos a dolicol es un paso esencial para el ensamblaje del dolicol-P-P-oligosacárido intermediario en la glicosilación de las proteínas.

En *M.rouxii*, por incorporación de marca a partir de [U- $^{14}$ C]glucosa, se obtuvieron sustancias en la fase orgánica de una partición cloroformo/ metanol/ agua (3:2:1), que fueron identificadas como Glc-P-Dol y Man-P-Dol por los siguientes criterios:

a) Resistencia a saponificación (NaOH 0,2 M por 10 min. a 37° C).

b) Retención en DEAE-celulosa (forma acetato) y elución a la misma concentración salina que Glc-P-Dol de hígado de rata (unión monofosfato).

c) Labilidad a hidrólisis ácida suave, (HCl pH 2, por 15 min. a 100°C), liberándose glucosa y manosa debido a la unión glicosídica a fosfato.

d) Volumen de elución en filtración por gel en presencia de desoxicolato de sodio, algo mayor a la de Glc-P-Dol de mamífero, indicando un tamaño menor del lípido. Se calculó el tamaño del dolicol de estos intermediarios en 15-16 unidades isoprenoides. Este valor es coincidente con el de *S.cerevisiae*<sup>102</sup>, siendo intermedio entre el mayor descrito, de mamíferos (19 unidades)<sup>140</sup> y el menor, de *Chrithidia fasciculata* (11 unidades)<sup>102</sup>.

e) Comportamiento en cromatografía de capa delgada:

-Con el solvente E, los derivados de *M.rouxii* tienen igual Rf que Glc-P-Dol de mamífero; GlcNAc-P-P-Dol de mamíferos tiene una migración mucho menor (Tabla 3). Esto condice con la unión monofosfato de los compuestos de *M.rouxii*.

-Con el solvente F los lípido-azúcares de *M.rouxii* migran en posición intermedia entre el de mamífero y el de bacteria indicando un tamaño intermedio del lípido.

-Con el solvente G se separaron Glc-P-Dol y Man-P-Dol de *M.rouxii* y cada uno migra algo menos que el derivado correspondiente de mamífero, debido, como en el caso del solvente F, al menor tamaño del lípido.

La síntesis de Glc-P-Dol y Man-P-Dol ha sido descripta *in vitro* a partir de microsomas de *Mucor rouxii* y los nucleótido-azúcares correspondientes<sup>106</sup>.

Debido a la presencia de 3-O-metilmanosa en las glicoproteínas de *M.rouxii* podría haber existido un lípido-azúcar con

3-O-MeMan. Tal hipotético intermediario no se encontró por hidrólisis ácida suave de dolicol-P-monosacáridos purificados por cromatografía en DEAE-celulosa (sección C.I.), provenientes de células incubadas con [U- $^{14}$ C]glucosa o [metil- $^{14}$ C]metionina. Tampoco se observó 3-O-MeMan por hidrólisis ácida suave de compuestos presentes en la fase acuosa de la partición de cloroformo/ metanol/ agua (3:2:1) o en los lavados con agua y metanol de las proteínas previo a ser tratadas con proteasa (ver esquema 1, sección B.III.5). Esto indicaría la ausencia de un nucleótido azúcar con 3-O-MeMan.

La incorporación de marca en los dolicol-P-monosacáridos era similar para las formas levadura y micelio, así como las características de los compuestos (fig. 30). No se han descrito en otros sistemas diferencias en la síntesis de Dol-P-monosacáridos relacionadas con morfogénesis o diferenciación celular. Sí se encontraron diferencias entre distintos estados metabólicos celulares: Células de mamífero, ayunadas de glucosa, sintetizan menos Man-P-Dol, y por lo tanto producen también un lípido oligosacárido intermediario modificado<sup>135</sup>. En nuestro laboratorio se encontró que organismos de la familia de los tripanosomátidos no sintetizan Glc-P-Dol y por lo tanto fabrican un lípido-oligosacárido diferente<sup>145, 146</sup>. Aunque el lípido-oligosacárido varía con la morfogénesis (esto se encontró para las formas amastigote y epimastigote de *T. cruzi*<sup>337</sup>, ver sección A.III.2.b. de la Introducción), no ocurre lo mismo con los Dol-P-monosacáridos.

## II. SEPARACION DE GLC-P-DOL Y MAN-P-DOL:

En vista de los últimos casos descriptos en la sección anterior, fue muy útil haber podido desarrollar un sistema cromatográfico no destructivo para poder separar Glc-P-Dol de

Man-P-Dol (ver sección C.II.).

El solvente utilizado para la cromatografía en capa delgada es una modificación del desarrollado por Quesada<sup>140</sup> que contenía ácido acético 1 N en vez de glacial. Aquel solvente no separaba Glc-P-Dol de Man-P-Dol, pero sí separaba lípido-azúcares por el tamaño del lípido<sup>334, 335</sup>. Esto nos llevó a pensar que la separación del derivado de glucosa del de manosa podía deberse a un distinto tamaño de sus porciones lipídicas. Esto había sido sugerido anteriormente por Bergman et al<sup>336</sup>.

Se estudió entonces el tamaño de los lípidos tanto de los derivados de *M.rouxii* como de los de hígado (sección C.II.). El tamaño de los lípidos en Man-P-Dol y Glc-P-Dol resultó igual en un mismo tipo de célula, siendo demostrado por dos criterios:

a) Filtración por gel: El dexoxicolato de sodio forma complejos de inclusión con ácidos grasos y poliprenoles uniéndose más moléculas cuanto mayor la cadena lipídica<sup>182</sup>. Por filtración por Sephadex G 75 en presencia de 0,5 % de desoxicolato de sodio, Man-P-Dol y Glc-P-Dol de hígado de rata resultaron ser de tamaño idéntico, algo mayor que los derivados de *M.rouxii* (siendo Glc-P-Dol y Man-P-Dol de este organismo iguales entre sí en cuanto al tamaño del lípido).

b) Tratamiento con periodato: Por tratamiento con periodato de sodio de Man-P-Dol y Glc-P-Dol se igualan sus porciones hidrofílicas. Los acetales dobles resultantes (sin reducción posterior) son relativamente estables en medio ácido<sup>49</sup> (ver fig. 31). Luego de este tratamiento Glc-P-Dol y Man-P-Dol tuvieron el mismo R<sub>f</sub> en TLC en solvente G (fig. 32).

### III. DOLICOL-P-P-OLIGOSACARIDOS:

Como señalamos en la sección A.III.2.a., el lípido-oligosacárido es el último intermediario lipídico, transfiriéndose su porción de azúcar a la proteína. En todos los eucariotes estudiados (mamíferos, insectos, plantas, hongos, protozoarios, etc.), se ha encontrado como intermediario el siguiente compuesto:  $\text{Glc} \rightarrow \text{Man} \rightarrow \text{GlcNAc}_2\text{-P-P-dolicol}$  (estructura en fig. 13). La única excepción son los intermediarios de protozoarios parásitos encontrados en nuestro laboratorio cuyo oligosacárido es más corto: *Trypanosoma cruzi*:  $\text{Man} \rightarrow \text{GlcNAc}_2$ ; *Chritidia fasciculata*:  $\text{Man} \rightarrow \text{GlcNAc}_2$ ; *Leishmania mexicana*:  $\text{Man} \rightarrow \text{GlcNAc}_2$ ; en ningún otro tripanosomátido estudiado fueron encontrados oligosacáridos glucosilados.

En *Mucor rouxii* encontramos el compuesto con 3 glucosas. Los criterios de identificación fueron:

- a) En una partición cloroformo/ metanol/ agua (3:2:1), el compuesto quedó en la interfase junto con las proteínas. De este precipitado proteico se extrajo diferencialmente con el solvente anfipático desarrollado en nuestro instituto: cloroformo/ metanol/ agua (10:10:3) <sup>339</sup>.
- b) En una cromatografía en DEAE-celulosa el compuesto era más retenido que los Dol-P-monosacáridos, eluyendo a una fuerza iónica igual a la que eluía el intermediario de mamífero, indicando una unión pirofosfato.
- c) Por hidrólisis ácida suave del compuesto eluido de la columna de DEAE-celulosa se liberó un oligosacárido que migró en



solvente A como  $\text{Glc} \rightarrow \text{Man} \rightarrow \text{GlcNAc}_2$  y cantidades muy pequeñas de otros que migraron como  $\text{Glc} \rightarrow \text{Man} \rightarrow \text{GlcNAc}_2$  y  $\text{Glc}_1\text{Man} \rightarrow \text{GlcNAc}_2$ . Esta labilidad a tratamiento ácido suave es debida a la unión pirofosfato.

d) Resistencia a tratamiento con fenol 50 % a 70 °C, indicando saturación de la unión  $\alpha$ -isoprenoide del dolicol, diferenciándose de los poliprenol-azúcares de bacterias<sup>324</sup>.

La estructura del oligosacárido resultó ser igual a la del intermediario de mamíferos<sup>72</sup> (fig.42). Esta estructura fue determinada por los siguientes criterios:

- Por desacetilación parcial y posterior electroforesis en medio ácido se determinó la existencia de dos hexosaminas.
- La sensibilidad a Endo H indicó una estructura mínima con di-N-acetil quitobiosa en el extremo reductor:

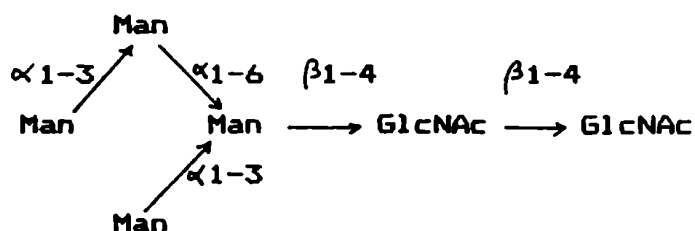


Fig. 83. Estructura indicada por sensibilidad a Endo H.

- Por hidrólisis ácida total se encontró glucosa y manosa. Se determinó parcialmente la ramificación y las uniones por acetólisis, tratamiento con  $\alpha$ -manosidasa, análisis de metilación, etc.

La metilación de manosas no ocurre a nivel del lípido-oligosacárido: Por hidrólisis total de éste (proveniente de células incubadas con [U- $^{14}$ C]glucosa) no apareció 3-O-MeMan. Tampoco se observó 3-O-MeMan en una hidrólisis total de la fracción correspondiente de lípido-oligosacáridos proveniente de células incubadas con [metil- $^{14}$ C]metionina.

La incorporación de marca radioactiva en el lípido-oligosacárido a partir de [U- $^{14}$ C]glucosa, tanto en la forma levadura como en la micelar, aumentó hasta unos 10 minutos de pulso. Luego comenzó a disminuir hasta casi desaparecer debido al consumo de la marca del medio. Esta cinética es debida a la transferencia del oligosacárido a las proteínas.

El intermediario Glc $\rightarrow$ Man $\rightarrow$ GlcNAc $_2$ -P-P-Dol resultó idéntico en las dos formas del hongo. No se han descripto diferencias en el lípido-oligosacárido por morfogénesis o diferenciación celular. Una excepción son los resultados de nuestro laboratorio que indican que la forma amastigote de *Trypanosoma cruzi* posee un lípido-oligosacárido diferente del de la forma epimastigote (Man $\rightarrow$ GlcNAc $_2$ -P-P-Dol y Man $\rightarrow$ GlcNAc $_2$ -P-P-Dol respectivamente)<sup>337</sup>. Aunque Man $\rightarrow$ GlcNAc $_2$ -P-P-Dol esta presente en amastigotes lo está en cantidades 4 a 5 veces menores que Man $\rightarrow$ GlcNAc $_2$ -P-P-Dol. Un caso en que se producen diferencias por el estado metabólico celular es, como indicamos anteriormente, el de células de mamíferos ayunadas de glucosa que sintetizan menos Man-P-Dol y por lo tanto se modifica también su lípido-oligosacárido pasando a ser Glc $\rightarrow$ Man $\rightarrow$ GlcNAc $_2$ -P-P-Dol en vez de Glc $\rightarrow$ Man $\rightarrow$ GlcNAc $_2$  que se encuentra en células normales<sup>100</sup>.

#### IV. GLICOPROTEINAS:

##### IV.1. 3-O-METILANOSA Y DIMORFISMO:

Como señalamos en la introducción los O-metil azúcares aunque generalmente presentes en cantidades muy pequeñas, no son infrecuentes en la naturaleza, especialmente en procariotes<sup>264,262</sup>. También han sido descriptos como constituyentes de polisacáridos de eucariotes inferiores: algas<sup>260</sup>, hongos<sup>266</sup> y algunos otros organismos generalmente con un hábitat ligado a la tierra. Hay un trabajo que describe 3-O-metil azúcares en un hidrolisado de una glicoproteína: la hemocianina de un gastrópodo<sup>279</sup>. Pero en ese trabajo no se estudia si los metil-azúcares están en oligosacáridos con unión O- o N-glicosídica a proteína.

Se demostró aquí la existencia de 3-O-metilmanosa como constituyente de oligosacáridos con unión N-glicosídica del tipo "polimanosa" en *Mucor rouxii*.

La migración de los oligosacáridos en electrofóresis en buffer borato de sodio y su sensibilidad a degradación por  $\alpha$ -manosidasa era inversamente proporcional al contenido de 3-O-metilmanosa: esta última impediría la acción de la exo-glicosidasa y dificultaría la formación de complejo con borato. Es importante señalar, sin embargo, que los oligosacáridos que contenían 3-O-metilmanosa eran clivados con endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa H.

Incluso en los oligosacáridos con mayor contenido de 3-O-metilmanosa la proporción de este sustituyente respecto de manosa era baja, (1:5 en un oligosacárido aislado de células incubadas durante 180 minutos con [U-<sup>14</sup>C]glucosa que migraba como un standard Man<sub>3</sub>:GlcNAc) a pesar de ser completamente resistentes a  $\alpha$ -manosidasa, lo que sugiere una baja ramificación y sustituyentes 3-O-metilmanosa en los extremos no reductores. Esto está de acuerdo con lo que indica el resultado del análisis de meti-

lación para oligosacáridos grandes marcados en células incubadas con [U- $^{14}$ C]glucosa; una cantidad muy pequeña de 2,3,4,6 tetra-O-metilmanosa (fig. 77). En oligosacáridos provenientes de células incubadas con [metil- $^{14}$ C]metionina se obtuvo por el contrario solamente 2,3,4,6 tetra-O-metilmanosa radioactiva en el análisis de metilación (fig. 62), confirmando la presencia de 3-O-metilmanosa sólo en los extremos reductores. Los oligosacáridos unidos N-glicosídicamente a proteína son por lo tanto de 3 tipos: con todos los extremos no reductores sustituidos con grupos metilo en posición 3; con sólo algunos de los extremos sustituidos; o "mananos" con los extremos no reductores libres. En los tres casos, las uniones preponderantes de las manosas son 1 $\rightarrow$ 2, existiendo poca ramificación.

La cantidad de glicoproteínas conteniendo 3-O-metilmanosa fue mucho mayor en la forma micelio (fig. 47 C y D). Esto está de acuerdo con el hecho de que los polisacáridos ricos en manosa de levaduras contienen generalmente sólo manosa, mientras que los de hongos micelares tienen también otros sustituyentes<sup>340, 111</sup>. García et al, estudiando los niveles de S-adenosil metionina (SAM) en el hongo *Mucor racemosus* (con un dimorfismo similar a *Mucor rouxii*) encontraron que ellos eran mucho más altos en la forma micelar que en la levadura. Al inducir la morfogénesis, el aumento en la concentración intracelular de SAM se correlacionaba con la emergencia de tubos germinales<sup>317</sup>. Vieron que también aumentaba la metilación de proteínas. En 1982 identificaron como sustrato principal de metilación al factor de elongación 1 $\alpha$ <sup>318</sup>. Si la misma situación se verificara para *Mucor rouxii*, podríamos afirmar que un cambio importante en el pasaje de la forma levadura a la micelar es también la metilación de residuos de manosa de glicoproteínas. Muy interesante es lo descrito por el mismo grupo en un trabajo aparecido recientemente<sup>319</sup>, en el que con un inhibidor específico de la SAM

sintetasa, la cicloleucina, el hongo crece sólo en la forma levadura sin pasar a la forma micelar al ser expuesto al aire. De esta manera se relaciona directamente la metilación con el dimorfismo.

A la hipótesis de trabajo elaborada por Bartnicki-García sobre el dimorfismo en *Mucor rouxii* (fig. 25) podríamos agregar:

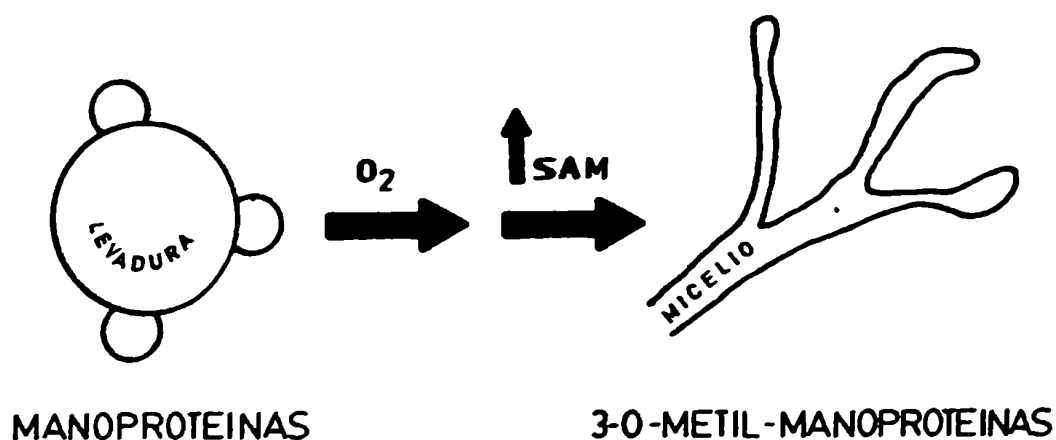


Fig. 84. Hipótesis de trabajo sobre dimorfismo y metilación en *Mucor*.

#### IV.2. BIOSINTESIS DE GLICOPROTEINAS Y DIMORFISMO:

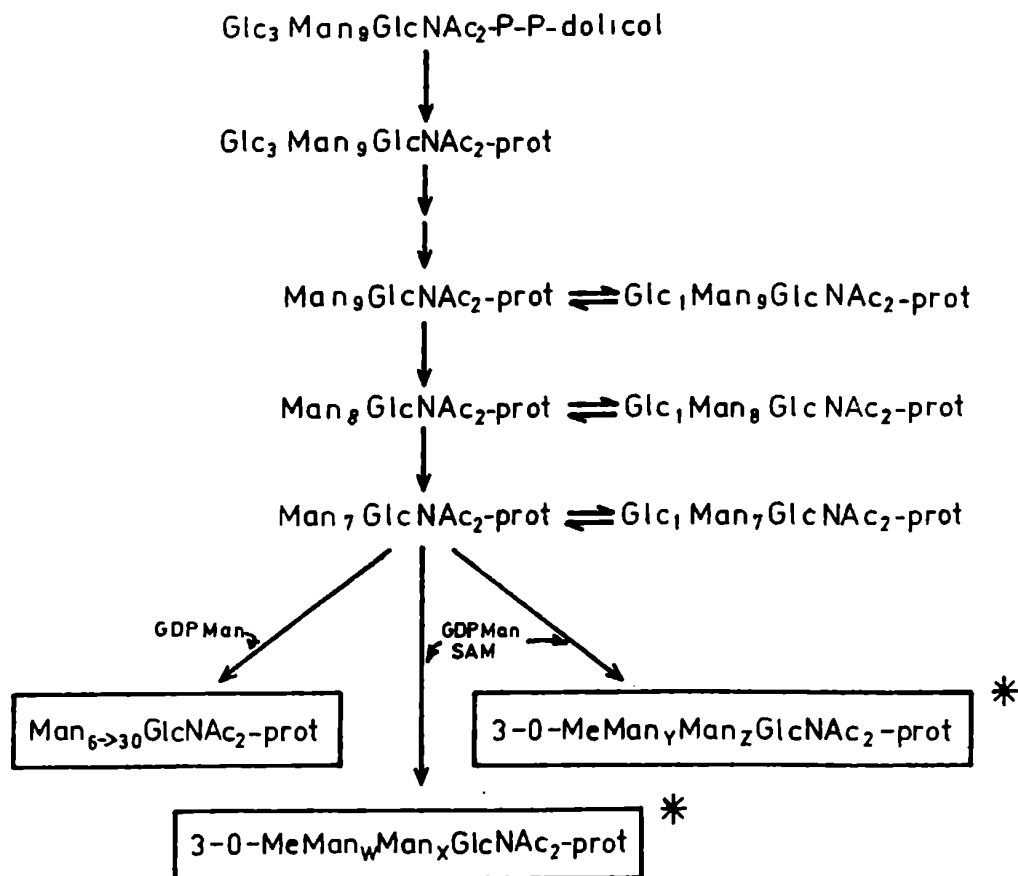
Las células de las formas levadura y micelio mostraron diferentes cinéticas de marcación radioactiva de los oligosacáridos N-glicosídicos. Mientras que en la forma levadura se marcaron muchos compuestos muy grandes con sólo 5 minutos de pulso con  $[U-^{14}C]$ glucosa, en la forma micelar se necesitaron pulsos de 180 minutos para marcar esos oligosacáridos (fig. 44 y 45).

Una posible explicación de esta diferencia podría ser que en la forma levadura haya mayor cantidad de estructuras del tipo manano (de pared celular) que en la micelar, que por su parte contendría mayor proporción de glicoproteínas con oligosacáridos relativamente cortos (por ejemplo enzimas secretadas como en *S. cerevisiae*). Esto estaría de acuerdo con la existencia de seis veces más manosa en la pared de la forma levadura que en el micelio<sup>320</sup>.

La cinética de incorporación en los oligosacáridos  $\text{Glc} \rightarrow \text{Man} \rightarrow \text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Glc} : \text{Man} \rightarrow \text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Man} \rightarrow \text{GlcNAc}_2$  y  $\text{Man} \rightleftharpoons \text{GlcNAc}_2$  (fig. 44 y 45) y la estructura de estos dos últimos a tiempos breves de incorporación (fig. 67 y 68) está de acuerdo con una transferencia a partir de  $\text{Glc} \rightarrow \text{Man} \rightarrow \text{GlcNAc}_2$ -P-P-Dol. Se determinó también la existencia de glucosilación transitoria a nivel de la proteína de  $\text{Man} \rightarrow \text{GlcNAc}_2$ , como se conocía para mamíferos<sup>140</sup>, tripanosomas<sup>144</sup> y plantas<sup>142</sup>, pero que no se había encontrado en *S. cerevisiae*.

El intermediario  $\text{Glc} \rightarrow \text{Man} \rightarrow \text{GlcNAc}_2$ -P-P-Dol no contiene restos de 3-O-metilmanosa, por lo que se puede concluir que la O-metilación ocurrió a nivel de la glicoproteína. Como se marcaron oligosacáridos muy pequeños al incubar con [<sup>14</sup>C]metionina, ( $\text{Man} \rightarrow \text{GlcNAc}$  y menores, fig. 59), la metilación debió ocurrir en oligosacáridos ya transferidos a proteína y no a nivel de GDPMan (como se indicó antes no se encontraron evidencias de que pudieran estar presentes nucleótido-azúcares metilados). El chase con metionina fría sugeriría que la metilación es el último paso en el procesamiento ya que según lo evidenciado por análisis de metilación (fig. 62), antes o después del chase sólo existía 3-O-metilmanosa en extremos no reductores.

El mecanismo general de biosíntesis sería:



\* mucho mas abundantes en la forma micelar

**Fig. 85. Mecanismo general de transferencia y procesamiento de oligosacáridos con unión N-glicosídica a proteína en *Mucor rouxii*.**

La metilación de restos de manosa representa, por lo tanto, una nueva reacción en el procesamiento de oligosacáridos con unión N-glicosídica. Se ha acumulado bastante información sobre los posibles roles de la metilación de DNA, RNA y proteínas<sup>214, 247</sup>. Aunque hay mucho menos información sobre las fun-

ciones de la metilación de azúcares, existe un estudio interesante sobre un polisacárido conteniendo 3-O-metilmanosa en bacterias. Este polisacárido participa en el mecanismo de síntesis de ácidos grasos, determinando el largo de éstos<sup>27a</sup>, como se vio en la Introduccion (sección A.IV.4). Es posible, por lo tanto, que la metilación de oligosacáridos unidos N-glicosídicamente a proteína, descrita en esta Tesis, pudiera tener un papel bioquímico, aparte de su función estructural en las glicoproteínas.







## BIBLIOGRAFIA



1. Lederkremer, G.Z. & Parodi, A.J., (1984), J.Biol.Chem. 259 12514.
2. Lederkremer, G.Z. & Parodi, A.J., (1983), J.Chrom. 262, 299.
3. Kornfeld, R. & Kornfeld, S., (1981), The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans, Ed. Lennarz, W.J., Plenum Press (N.Y.), 1-27.
4. Gottschalk, A. (Ed.) (1972), Glycoproteins, 2nd. Ed., Elsevier, Amsterdam.
5. Sharon, N. (1975) Complex carbohydrates, (1975), Complex carbohydrates, Addison-Westley Publ. Co.
6. Strecker, G. & Montreuil, J., (1979), Biochimie 61, 1199.
7. Mescher, M.F., (1981), Trends Biochem.Sci. 6, 97.
8. Fuerse, J. & Kaplan, N.O. (1968), J. Biol. Chem. 243, 6072
9. Berry, S.A., Johnson, K.G. & Campbell, J.N. (1970), Biochim. Biophys. Acta 220, 269.
10. Okuda, S. & Weinbaum, G. (1968), Biochemistry 7, 2819.
11. Mendelzon, D.H. & Parodi, A.J. (1984), Presentacion No. 420 al IV Congreso Panamericano de Bioquímica (PAABS), Bs.Aires.
12. Groisman, J., (1985), Tesis Doctoral, Fac. de Ciencias Ex. y Nat., U.B.A.
13. Wolfenson, C., (1985), Tesis Doctoral, Fac. de Ciencias Ex. y Nat., U.B.A.
14. Spiro, R.G., (1973), Adv. Prot. Chem. 27, 349.
15. Lote, C.J. & Weiss, J.B., (1971), Febs Lett. 16, 81.
16. Weiss, J.B. , Lote, C.J. & Bobinski, H., (1971) Nature 234, 25.
17. Wieland, F., Heitzer, R. & Schaefer, W., (1983), Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. 80, 5470.
18. Anderson, B., Seno, N., Sempson, P., Riley, J.G., Hoffman, P. & Meyer, K., (1964), J. Biol. Chem. 239, PC2716.
19. Tanaka, K. & Pigman, W. (1965), J. Biol. Chem. 240, PC1487
20. De Vries, A.L., Vandenheede, J. & Feeney, R.E. (1971), J. Biol. Chem. 246, 305.
21. Feizi, T., Kabat, E.A., Vicari, G., Anderson, B. & Marsh, W. L. (1971), J.Immunol. 106, 1578.
22. Lindahl, J. & Roden, L. (1966), J. Biol. Chem. 241, 2113.

23. Muir, L. & Lee, Y.C. (1969) J. Biol. Chem. 244, 2343.
24. Hallgren, P., Lindblad, A. & Svensson, S. (1975), J. Biol. Chem. 250, 5312.
25. Nakajima, T. & Ballou, C.E., (1974), J. Biol. Chem. 249, 7679.
26. Fume, J., Krusius, T., Margolis, R.K. & Margolis, R.V., (1979), J. Biol. Chem. 254, 10295.
27. Butler, W.T. & Cunningham, L.W. (1966), J. Biol. Chem. 241, 3882.
28. Spiro, R.G., (1967), J. Biol. Chem. 242, 4813.
29. Lamport, D.T.A. (1969), Biochemistry 8, 1155.
30. Marks, G.S., Marshall, R.D. & Neuberger, A. (1963), Biochem. J. 87, 274.
31. Beeley, J., (1977), Biochem. Biophys. Res. Comm. 76, 1051.
32. Takahashi, T., Schmidt, P.G. & Tang, J. (1983), J. Biol. Chem. 258, 2819.
33. Parodi, A.J. & Leloir, L.F., (1979) Biochim. Biophys. Acta 559, 1.
34. Debray, H., (1983), Lectins, Vol. III, Ed. T.C. Bog Hansen, G.A. Spengler, Gruyer & Co., (Berlin).
35. Montreuil, J., Debray, H., Debeire, P. & Delannoy, P., (1983), Structural carbohydrates in the liver, Proc. of the 34th Falk Symposium, Basel 12-18 Oct., 1982. MTP Press lim., 239.
36. Couto, A., Katzin, A.M. & Colli, W. (1984), Presentacion No. 449 al IV Congreso Panamericano de Bioquimica (PAABS), Bs.As
37. Neufeld, E.F., Sando, G.W., Garvin, A.J. & Rome, L., (1977), J. Supramol. Struct. 6, 95.
38. Roden, L. (1980), Referencia 1, pg. 267-371.
39. Prehm, P., Scheid, A. & Choppin, P.W., (1979), J. Biol. Chem. 254, 9669.
40. Tai, T., Yamashita, K. & Kobata, A., (1977), Biochem. Biophys. Res. Commun. 78, 434.
41. Fukuda, M., Kondo, T. & Osawa, T., (1976), J. Biochem. (Tokyo) 80, 1223.
42. Yamashita, K., Tachibana, Y. & Kobata, A., (1978), J. Biol. Chem. 253, 3862.

43. Varki, A. & Kornfeld, S. (1983), *J. Biol. Chem.* 258, 2808.
44. Dorland, L., Halbeck, H. van, Vliegenhart, J.F.G., Lis, H. & Sharon, N. (1981), *J. Biol. Chem.* 256, 7708.
45. Yamaguchi, H., Ikenaka, T. & Matsushima, Y. (1971), *J. Biochem. (Tokyo)* 70, 587.
46. Nakajima, T. & Ballou, C.E., (1974), *J. Biol. Chem.* 249, 7685.
47. Tai, T., Yamashita, K., Ito, S. & Kobata, A. (1977), *J. Biol. Chem.* 252, 6687.
48. Tsuji, T., Yamamoto, K., Irimura, T. & Osawa, T. (1981), *Biochem. J.*, 195, 691.
49. Yamashita, K., Mizuochi, T. & Kobata, A. (1982), *Meth. Enzymol.* 83, 105.
50. Liang, C.J., Yamashita, K., Muellenberg, C., Shichi, H. & Kobata, A. (1979), *J. Biol. Chem.* 254, 6414.
51. Cahour, A., Debeire, P., Hartmann, L. & Montreuil, J. (1983) *Bioch. J.* 211, 55.
52. Montreuil, J. (1982), *Compr. Biochem.* 193, part II, 1-188.
53. Atkinson, P.H., Grey, A., Carver, J.P., Hakimi, J. & Ceccarini, C. (1981), *Biochemistry* 20, 3979.
54. Swiedler, S.J., Hart, G.W., Tarentino, A.L., Plummer, T.H. Jr. & Freed, J.H. (1983), *J. Biol. Chem.* 258, 11515.
55. Edelman, G., (1983), *Science (Wash. D.C.)* 219, 450.
56. Cohen, K.A., Schellenberg, K., Benedek, K., Karger, B.L., Grego, B. & Hearn, M.T.W. (1984), *Anal. Bioch.* 140, 223-235.
57. Goldstein, I.J. & Hayes, C.E. (1978), *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 35, 127.
58. Kristiansen, T., (1974), *Meth. Enzym.* 34, 331.
59. Debray, H., Decout, D., Strecker, G., Spik, G. & Montreuil, J. (1981), *Eur. J. Biochem.* 117, 41.
60. Cummings, R.D. & Kornfeld, S. (1982), *J. Biol. Chem.* 257, 11235.
61. Ugalde, R.A. (1980), *Tesis Doctoral, Fac. de Ciencias Ex. y Nat., U.B.A.*
62. Lee, Y.C. & Scoocca, J.R. (1972), *J. Biol. Chem.* 247, 5753.
63. Bayard, B. & Roux, D. (1975), *Febs Lett.* 55, 206.
64. Elder, J.H. & Alexander, S. (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci.*

(U.S.A.) 79 4540.

65. Tai, T., Yamashita, K., Ogata-Arakawa, M., Koide, N., Muramatsu, T., Iwashita, S., Inone, Y. & Kobata, A. (1975), *J.Biol.Chem.* **250**, 8569.
66. Honda, S. (1984), *Anal.Biochem.* **140**, 1.
67. Spiro, R.G. (1972), *Meth.Enzymol.* **28**, 3.
68. Kocourek, J. & Ballou, C.E. (1969), *J.Bacteriol.* **100**, 1175
69. Goldstein, I.J., Hay, G.W., Lewis, B.A. & Smith, F. (1965), *Meth.Carbohydr.Chem.* **5**, 361.
70. Lindberg, B. & Lonngren, J. (1978), *Meth.Enzymol.* **50**, 3.
71. Hakomori, S. (1964), *J.Biochem. (Tokyo)* **55**, 205.
72. Li, E., Tabas, I. & Kornfeld, S. (1978), *J.Biol.Chem.* **253**, 7762.
73. McNeil, M., Darvill, A.G., Aman, P., Granzen, L.E. & Albersheim, P. (1982), *Meth.Enzymol.* **83**, 3.
74. Bjorndall, H., Hellerqvist, C.G., Lindberg, B. & Svensson, S (1970), *Angew.Chemie Int.Ed.Engl.* **9**, 610.
75. Parente, J.P., Wieruszkeski, J.M., Strecker, G., Montreuil, J., Fournet, B., Halbeek, H. van, Dorland, L. & Vliegenthart J.F.G. (1982), *J.Biol.Chem.* **257**, 13173.
76. Blanchard, D., Cartron, J.P., Fournet, B., Montreuil, J., Halbeek, H. van, Vliegenthart, J.F.G. (1983), *J.Biol.Chem.* **258**, 7691.
77. Dijkstra, B.W., Vliegenthart, J.F.G., Strecker, G. & Montreuil, J. (1983), *Eur.J.Biochem.* **130**, 111.
78. Dell, A., Morris, H.R., Egge, H., Nicolai, H. von, Strecker, G. (1983), *Carbohydr.Res.* **115**, 41.
79. Kamerling, J.P., Herma, W., Vliegenthart, J.F.G., Glegen, B. W., Lewis, I.A.S., Strecker, G. & Spik, G. (1983), *Biomed. Mass Spectr.* **10**, 420.
80. Bush, C.A., Dua, V.K., Ralapati, S., Warren, C.D., Spik, G., Strecker, G. & Montreuil, J. (1982), *J.Biol.Chem.* **257**, 8199.
81. Montreuil, J. (1983), *Biochem.Soc.Trans.* **11**, 134.
82. Manners, D.J., Masson, A.J. & Patterson, J.C. (1973), *Biochem.J.* **135**, 19.
83. Manners, D.J., Masson, A.J., Patterson, J.C., Bjorndall, H.

- & Lindberg, B. (1973), *Biochem.J.* 135, 31.
84. Fleet, G.H. & Manners, D.J. (1977), *J.Gen.Microb.* 98, 315.
85. Bacon, J.S.D., Farmer, V.C., Jones, D. & Taylor, I.F. (1969), *Biochem.J.* 114, 557.
86. Haworth, W.N., Heath, R.L. & Peat, S. (1941) *J.Chem.Soc. (Lond.)*, 833.
87. Peat, S., Turvey, J.R. & Doyle, D. (1961), *J.Chem.Soc. (Lond.)* 29, 3918.
88. Ballou, C.E. (1974), *Adv.Enzymol.* 40, 239.
89. Thieme, T.T. & Ballou, C.E. (1971), *Biochemistry* 10, 4121.
90. Cohen, R.E., Zhang, W.J. & Ballou, C.E. (1982), *J.Biol.Chem.* 257, 5730.
91. Tsai, P.K., Frevert, J. & Ballou, C.E. (1984), *J.Biol.Chem.* 259, 3805.
92. Trimble, R.B. & Maley, F. (1977), *J.Biol.Chem.* 252, 4409.
93. Lehle, L., Cohen, R.E. & Ballou, C.E. (1979), *J.Biol.Chem.* 254, 12209.
94. Neumann, N.P. & Lampen, J.O. (1969), *Biochemistry* 8, 3552.
95. Hashimoto, C., Cohen, R.E., Zhang, W.J. & Ballou, C.E. (1981), *Proc.Natl.Acad.Sci.* 78, 2244.
96. Satav, J.G., Johnston, R.F., Monk, B. & Criddle, R.S. (1980), *Arch.Biochem.Biophys.* 199, 110.
97. Boer, P. & Steyn-Parve, E.P. (1966), *Biochim.Biophys.Acta* 128, 400.
98. Phaff, H.J. (1971), *The Yeasts*, Ed. Rose, A.H. & Harrison, J.S., Academic Press (Lond.), 135-210.
99. Bacon, J.S.D. (1981), *Yeast Cell Envelopes*, Ed. Arnold, W.N CRC Press Inc., Vol I, 65-85.
100. Sietsma, J.H. & Wessels, J.G.H. (1979), *J.Gen.Microbiol.* 114, 99.
101. Webster, J. (1980), *Introduction to Fungi*, 2nd. Ed., Cambridge Univ. Press, pg. 59.
102. Slodki, N.E., Safranski, M.J., Hensley, D.E. & Babcock, G. E. (1970), *Appl.Microbiol.* 19, 1019.
103. Gorin, P.A.J., Horitsu, K. & Spencer, J.F.T. (1965), *Can.J.Chem.* 43, 950.
104. Gorin, P.A.J. & Mazurek, M. (1974), *Can.J.Chem.* 52, 3070.



105. Bardalaye, P.C. & Nordin, J.H. (1977), J.Biol.Chem. **252**, 2584.
106. Barreto-Bergter, E.M., Travassos, L.R. & Gorin, P.A.J. (1980), Carbohydr.Res. **86**, 273.
107. Gorin, P.A.J., Spencer, J.F.T. & Magus, R.J. (1969), Can.J.Chem. **47**, 3559.
108. Gorin, P.A.J., & Spencer, J.F.T. (1968), Can.J.Chem. **47**, 2299.
109. Rick, P.D., Drewes, L.R. & Gander, J.E. (1974), J.Biol.Chem. **249**, 2073.
110. Gorin, P.A.J. & Spencer, J.F.T. (1970), Adv.Appl.Microbiol. **13**, 25.
111. Mendonca, L., Gorin, P.A.J., Lloyd, K.D. & Travassos, L.R. (1976), Biochemistry **15**, 2423.
112. Alviano, C.S., Gorin, P.A.J. & Travassos, L.R. (1979), Exp.Mycol. **3**, 174.
113. Lee, T.H., Arai, M. & Murao, S. (1981), Agr.Biol.Chem. **45**, 2343.
114. Yamada, H., Ohshima, Y. & Miyazaki, T. (1982), Carbohydr. Res. **110**, 113.
115. Cherniak, R., Reiss, E. & Turner, S.H. (1982), Carbohydr. Res. **103**, 239.
116. Fraser, C.G., Jennings, H.J. & Moyna, P. (1973), Can.J. Biochem. **51**, 225.
117. Gorin, P.A.J., Spencer, J.F.T. & Finlayson, A.J. (1971), Carbohydr. Res. **16**, 161.
118. Barreto-Bergter, E. & Gorin, P.A.J. (1983), Adv.Carb.Chem. Biochem. **41**, 68.
119. Abdel-Fattah, A.F. & Edrees, M. (1977), Phytochemistry **16** 939.
120. Dey, P.M. (1978), Adv.Carb.Chem.Biochem. **35**, 341.
121. Referencia No. 3, pg. 85-160.
122. Schachter, H. (1978), The Glycoconjugates, Vol. II, Ed. Horowitz, M.I. & Pigman, W., Academic Press, N.York, pg. 87.
123. Schwartz, N.B. & Roden, L. (1974), Carbohydr.Res. **37**, 167.
124. Referencia No.122, pg. 49.
125. Lehle, L. & Tanner, W. (1974), Biochim.Biophys.Acta **350**,

- 225.
126. Sharma, C.B., Babczinski, P., Lehle, L. & Tanner, W. (1974) Eur.J.Biochem. 46, 35.
  127. Haselbeck, A. & Tanner, W. (1983), Febs Lett. 158, 335.
  128. Bretthauer, R.K. & Wu, S. (1975), Arch.Biochem.Biophys. 167, 151.
  129. Gold, M.H. & Halm, H.J. (1976), Biochemistry 15, 1808.
  130. Letoublon, R. & Got, R. (1974), Febs Lett. 46, 214.
  131. Behrens, N.H. & Leloir, L.F. (1970), Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.) 66, 153.
  132. Behrens, N.H., Parodi, A.J., Leloir, L.F. & Krisman, C.R. (1971), Arch.Biochem.Biophys. 143, 375.
  133. Parodi, A.J., Behrens, N.H., Leloir, L.F. & Carminatti, H. (1972), Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A.) 69, 3268.
  134. Struck, D.K. & Lennarz, W.J. (1981), Referencia No. 3, pg. 35-73.
  135. Hubbard, S.C. & Ivatt, R.J. (1981), Ann.Rev.Biochem. 50, 555.
  136. Staneloni, R.J. & Leloir, L.F. (1982), CRC - Crit. Rev. in Biochem., 289.
  137. Schwartz, R.T. & Datema, R. (1982), Adv.Carb.Chem.Biochem. 40, 287.
  138. Rosner, H.R., Hubbard, S.C., Ivatt, R.J. & Robbins, P.W. (1982), Meth.Enzymol. 83, 399.
  139. Mentaberry, A., Tesis Doctoral, Fac. de Ciencias Ex. y Nat. U.B.A.
  140. Quesada-Allue, L.A., Tesis Doctoral, Fac. de Ciencias Ex. y Nat., U.B.A.
  141. Iñon de Iannino, N., Tesis Doctoral, Fac. de Ciencias Ex. y Nat., U.B.A.
  142. Parodi, A.J., Mendelzon, D.H., Lederkremer, G.Z. & Martin-Barrientos, J. (1984), J.Biol.Chem. 259, 6351.
  143. Hubbard, S.C. & Robbins, P.W. (1979), J.Biol.Chem. 254, 4568.
  144. Lehle, L., Schulz, I. & Tanner, W. (1980), Arch.Microbiol. 127, 231.
  145. Parodi, A.J., Quesada-Allue, L.A. & Cazzulo, J.J. (1981),

- Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A.) 78, 6201.
146. Parodi, A.J. & Quesada-Allue, L.A. (1982), J.Biol.Chem. 257, 7637.
  147. Parodi, A.J., Martin-Barrientos, J. & Engel, J.C. (1984), Biochem.Biophys.Res.Comm. 118, 1.
  148. Mankowski, T., Jankowski, W., Chojnacki, T. & Franke, P. (1976), Biochemistry 15, 2125.
  149. Beedle, A., Walton, M. & Goodwin, T.W. (1975), Insect Biochem. 5, 465.
  150. Tavares, F.A., Johnson, N.I. & Hemming, E.W. (1977), Bioch. Soc.Transact. 5, 1771.
  151. Adrian, G.W. & Keenan, R.W. (1981), Biochim.Biophys.Acta 663, 637.
  152. Quesada-Allue, L.A. & Parodi, A.J. (1983), Biochem.J. 212 123.
  153. Harford, J.B., Waechter, C.J. & Earl, F.L. (1977), Biochem. Biophys.Res.Comm. 76, 1036.
  154. Harford, J.B., Waechter, C.J. (1980), Biochem.J. 188, 481
  155. Rearick, J.I., Chapman, A. & Kornfeld, S. (1981), J.Biol. Chem. 256, 6255.
  156. Lehle, L. & Tanner, W. (1976), Febs Lett. 71, 167.
  157. Bause, E. & Hettkamp, H. (1979), Febs Lett. 108, 341.
  158. Lehle, L.A. & Bause, E. (1984), Biochim.Biophys.Acta 799, 246.
  159. Turco, S.J., Stetson, B. & Robbins, P.W. (1977), Proc.Natl. Acad.Sci.(U.S.A.) 74, 4411.
  160. Turco, S.J. & Robbins, P.W. (1979), J.Biol.Chem. 254, 4560.
  161. Grinna, L.S. & Robbins, P.W. (1979), J.Biol.Chem. 254, 8814.
  162. Ugalde, R.A., Staneloni, R.J. & Leloir, L.F. (1979), Biochem.Biophys.Res.Comm. 91, 1174.
  163. Bischoff, J. & Kornfeld, R. (1983), J.Biol.Chem. 258, 7907.
  164. Parodi, A.J., Lederkremer, G.Z. & Mendelzon, D.H. (1983), J.Biol.Chem. 258, 5589.
  165. Parodi, A.J., Mendelzon, D.H. & Lederkremer, G.Z. (1983), J.Biol.Chem. 258, 8260.

166. Referencia No. 135, pg. 572.
167. Datema, R., Romero, P.A., Legler, G. & Schwarz, R.T. (1982) Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A.) 79, 6787.
168. Tulsiani, D.R.P., Opheim, D.J. & Touster, O. (1977), J.Biol Chem. 252, 3227.
169. Tabas, I. & Kornfeld, S. (1979), J.Biol.Chem. 254, 11655.
170. Tabas, I. & Kornfeld, S. (1978), J.Biol.Chem. 253, 7779.
171. Harpaz, N. & Schachter, H. (1980), J.Biol.Chem. 255, 4894
172. Hoflack, B., Debiere, P., Cacan, R., Montreuil, J., Verbert A. (1982), Eur.J.Biochem. 124, 527.
173. Liu, T., Stetson, B., Turco, S.J., Hubbard, S.C. & Robbins, P.W. (1979), J.Biol.Chem. 254, 4554.
174. Yamashita, K., Kamerling, J.P. & Kobata, A. (1983), J.Biol. Chem. 258, 3099.
175. Parodi, A.J., comunicacion personal.
176. Parodi, A.J. (1981), Arch.Biochem.Biophys. 210, 372.
177. Parodi, A.J. (1979), J.Biol.Chem. 254, 10051.
178. Byrd, J.C., Tarentino, A.L., Maley, F., Atkinson, P.H. & Trimble, R.B. (1982), J.Biol.Chem. 257, 14657.
179. Parodi, A.J. (1979), J.Biol.Chem. 254, 8343.
180. Lehle, L. (1980), Eur.J.Biochem. 109, 589.
181. Karson, E. & Ballou, C.E. (1978), J.Biol.Chem. 253, 6484.
182. Parodi, A.J. (1977), Eur.J.Biol. 75, 171.
183. Bretthauer, R.K., Wu, S. & Irwin, W.E. (1973), Biochim. Biophys. Acta 304, 736.
184. Letoublon, R.C.P., Compte, J. & Got, R. (1973), Eur.J. Biochem. 40, 95.
185. Crean, E.V. & Rossomando, E.F. (1977), Biochim.Biophys. Acta 498, 439.
186. Bernard, E.A., Guaragna, R., Amaral, B.B., Perry, M.L.S., Pereira, I.R.G., Ielpi, L. & Couso, R.O. (1982), Mol.Cel. Biochem. 45, 41.
187. Melchers, F. (1973), Biochemistry 12, 1471.
188. Hickman, S., Kulczycki, A., Lynch, R. & Kornfeld, S. (1977) J.Biol.Chem. 252, 4402.
189. Schwarz, R.T., Rohrschneider, J.M. & Schmidt, M.F.G. (1976) J.Virol. 19, 782.

190. Huber, R. (1976), Tr.Bioch.Sci 1, 174.
191. Gibson, R., Schlesinger, S. & Kornfeld, S. (1979), J.Biol. Chem. 254, 3600.
192. Schlesinger, S., Malfer, C. & Schlesinger, M.J. (1984), J. Biol.Chem. 259, 7597.
193. Olden, K., Pratt, R.M. & Yamada, K. (1978), Cell 13, 461.
194. Komoda, T. & Sakagishi, Y. (1978), J.Biol.Chem. 238, 1396
195. Kuo, S.C. & Lampen, J.C. (1974), Biochem.Biophys.Res.Commun 58, 287.
196. Wu, A.M., Kabat, E.A., Nilsson, B., Zopf, D.A., Gruezo, F.G & Liao, J. (1984), J.Biol.Chem. 259, 7178.
197. Morell, A.G., Irwine, R.A., Sternlieb, I.H., Hickman, J. & Ashwell, G. (1970), J.Biol.Chem. 245, 9397.
198. Neufeld, E.F., Lim, T.W. & Shapiro, L.J. (1975), Ann.Rev. Biochem. 44, 357.
199. Kaplan, A., Achord, D.T. & Sly, W.S. (1977), Proc.Natl.Acad Sci.(U.S.A.) 74, 2026.
200. Sly, W.S., Fischer, H.O. (1982), J.Cell.Biochem. 18, 67.
201. Frazier, W. & Glaser, L. (1979), Ann.Rev.Biochem. 48, 491
202. Curtis, A.S.G. (1978), 32nd. Symp.Soc.Exp.Biol. 1977, Cambridge Univ. Press, London.
203. Pierce, M. & Ballou, C.E. (1983), J.Biol.Chem. 258, 3576.
204. Bleil, J.D. & Wasserman, P.M. (1980), Cell 20, 873.
205. Jumblatt, J.E., Schlup, V. & Burger, M.M. (1980), Biochem. 19, 1038.
206. Harrison, F.L. & chesterton, C.J. (1980), Febs Lett. 122, 157.
207. Knudsen, K.A., Rao, P.E., Damsky, C.E., Buck, C.A. (1981), Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A.) 78, 6071.
208. Pearstein, E., Gold, L.I. & Garcia-Pardo, A. (1980), Mol. Cell.Biochem. 29, 103.
209. Birchmeier, C., Kreis, T. E., Eppenberger, F. M., Winterhalter, K.H. & Birchmeier, W. (1980), Proc.Natl.Acad Sci.(U.S.A.) 77, 4108.
210. Yamada, K.M., Yamada, S.S. & Pastan, I. (1975), Proc.Natl. Acad.Sci.(U.S.A.) 72, 3158.
211. Terranova, V.P., Rohrbach, P.H. & Martin, G.R. (1980), Cell

- 22, 719.
212. Yogeewaran, G., Salk, P.L. (1981), *Science* 212, 1514.
213. Takasaki, S., Ikehira, H., Kobata, A. (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92, 735.
214. Doerfler, W. (1983), *Ann. Rev. Biochem.* 52, 93.
215. Lacks, S., Greenberg, B. (1975), *J. Biol. Chem.* 250, 4060.
216. Razin, A. & Riggs, A.D. (1980), *Science* 210, 604.
217. Naveh-Manly, T. & Cedar, H. (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 78, 4246.
218. Felsenfeld, G., Nickol, J., McGhee, J. & Behe, M. (1982), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 47, 577.
219. Desrosiers, R.C., Mulder, C. & Fleckenstein, B. (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 76, 3839.
220. Vardimon, L., Kuhlmann, I., Cedar, H. & Doerfler, W. (1981) *Eur. J. Cell Biol.* 25, 13.
221. Vardimon, L., Gunthert, U. & Doerfler, W. (1983), *Mol. Cell. Biol.* 2, 1574.
222. Waechter, D.E. & Baserga, R. (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 79, 1106.
223. Kuhlmann, I. & Doerfler, W. (1982), *Virology* 118, 169.
224. Lepeyre, J.N. & Becker, F.F. (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 87, 698.
225. McGeady, M.L., Ascione, R., van de & Woude, G.F. (1982), *Cold Spring Harbor Tumor Virus Meeting (Abstr.)*.
226. Taylor, S.M. & Jones, P.A. (1982), *J. Cell Physiol.* 111, 187.
227. Jones, P.A., Taylor, S.M., Mohandas, T. & Shapiro, L.J. (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 79, 1215.
228. Harris, M. (1982), *Cell* 29, 483.
229. Sano, H., Royer, H.D. & Sager, R. (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 77, 3581.
230. Mohandas, T., Sparkes, R.S. & Shapiro, L.J. (1981), *Science* 211, 393.
231. Mohandas, T., Sparkes, R.S., Hellkuhl, B., Grezeschik, K.H. & Shapiro, L.J. (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 77, 6759.
232. Youssoufian, H., Hammer, S.M., Hirsch, M.S. & Mulder, C.

- (1982), *Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A.)* 79, 2207.
233. Glick, J.M., Averyhart, V.M. & Leboy, P.S. (1978), *Biochim. Biophys.Acta* 518, 158.
234. Noller, H.F. (1984), *Ann.Rev.Biochem.* 53, 119.
235. Carbon, P., Ehresmann, B. & Ebel, J.P. (1979), *Eur.J. Biochem.* 100, 399.
236. Salim, M. & Maden, B.E.H. (1981), *Nature* 291, 205.
237. Cundliffe, E. & Thompson, J. (1979), *Nature* 278, 859.
238. Thompson, J. & Cundliffe, E. (1981), *J.Gen.Microb.* 124, 291.
239. Helser, T.L., Davies, J.E. & Dahlberg, J.E. (1971), *Nature new Biol.* 233, 12.
240. Lai, C.J. & Weisblum, B. (1971), *Proc.Natl.Acad.Sci.* 68, 856.
241. Rottman, F.M., Desrosiers, R.C. & Friederici, K. (1976), *Prog.Nucl.Ac.Res.Mol.Biol.* 19, 21.
242. Funichi, Y., Muthukrishnan, S., Tomasz, J., Shatkin, A.J. (1976), *J.Biol.Chem.* 251, 5043.
243. Perry, R.P., Kelly, D.E., Friederici, K.H. & Rottman, F.M. (1975), *Cell* 6, 13.
244. Both, G.W., Banerjee, A.K. & Shatkin, A.J. (1975), *Proc. Natl.Acad.Sci.(U.S.A.)* 72, 1189.
245. Hickey, E.D., Weber, L.A. & Baglioni, C. (1976), *Proc.Natl. Acad.Sci.(U.S.A.)* 73, 19.
246. Both, G.W., Funichi, Y., Muthukrishnan, S. & Seratkin, A.J. (1975), *Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A.)* 72, 362.
247. Paik, W.K. & Kim, S. (1976), *Adv.Enzym.* 42, 227.
248. Baldwin, G.S. & Carnegie, P.R. (1971) *Science* 171, 579.
249. Kleene, J., Toews, M.L. & Adler, J. (1977), *J.Biol.Chem.* 252, 3214.
250. Werf, P. van der & Koshland, D.E. Jr. (1977), *J.Biol.Chem.* 279, 2793.
251. Shaw, P., Lopes Gomes, S., Sweeney, K., Ely, B., Shapiro, L. (1983), *Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A.)* 80, 5261.
252. Taylor, B.L. (1983), *Trends Biochem.Sci.* 8, 438.
253. Mato, J.M. & Marin-Cao, D. (1979), *Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.)* 76, 6106.

254. Pike, M.C., Kredlich, N.M. & Snyderman, R. (1978), *Proc. Natl.Acad.Sci.(U.S.A.)* 75, 3928.
255. O'Dea, R.F., Viveros, O.H., Axelrod, J., Ashwankumar, S., Schiffman, E. & Corcoran, B.A. (1978), *Nature* 272, 462.
256. Diliberto, E.J., Jr., Viveros, O.H., Axelrod, J. (1976), *Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A.)* 73, 4050.
257. Watterson, D.M., Harrelson, W.G.Jr., Keller, P.M., Shariff, F., & vanaman, T.C. (1976), *J.Biol.Chem.* 252, 4501.
258. Bouveng, H.O., Fraser, R.N. & Lindberg, B. (1967), *Carbohydr.Res.* 4, 10.
259. Scheer, E., Terai, T., Kulkarni, S., Conant, N.F., Wheat, R.W. & Lowe, E.P. (1970), *J.Bacteriol.* 103, 525.
260. Fichtinger-Schepman, A.M.J., Kamerling, J.P., Vliegenhart, J.F.G., Jong, E.W. de, Bosch, L. & Westbrock, P. (1979), *Carbohydr.Res.* 69, 181.
261. Fareed, J.S. & Percival, E. (1977), *Carbohydr.Res.* 53, 276.
262. Bacon, J.S.D. & Cheshire, M.V. (1971), *Biochem.J.* 124, 555.
263. Ogner, G. (1980), *Soil Science* 129, 1.
264. Weckesser, J., Drews, G. & Mayer, H. (1979), *Ann.Rev. Microbiol.* 33, 215.
265. Schrader, M., Drews, G., Weckesser, J. & Meyer, M. (1982), *J.Gen.Microbiol.* 128, 273.
266. Tharanathan, R.N., Mayer, H. & Weckesser, J. (1978), *Biochem.J.* 171, 403.
267. Pape, H. & Brillinger, G.J. (1973), *J.Arch.Mikrobiol.* 88, 25.
268. Saadat, S. (1983), *Doctoral dissertation, Univ.Calif., Berkeley.*
269. Kauss, H. & Hassid, W.Z. (1967), *J.Biol.Chem.* 242, 1680.
270. Weisman, L.S. & Ballou, C.E. (1984), *J.Biol.Chem.* 259, 3464.
271. Buzzetti, F., Eisenberg, F., Grant, H.N., Keller-Schierlein W., Voser, W. & Zalmer, H. (1968), *Experientia* 24, 320.
272. Gros, E.G., Deulofeu, V., Galmarini, D.L. & Frydman, B. (1968), *Experientia* 24, 323.



- 273. Ballou, C.E. (1981), *Pure Appl.Chem.* 53, 107.
- 274. Forsberg, L.S., Dell, A., Walton, D.J. & Ballou, C.E. (1982), *J.Biol.Chem.* 257, 3555.
- 275. Machida, Y. & Bloch, K. (1973), *Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A.)* 70, 1146.
- 276. Yabusaki, K.K. & Ballou, C.E. (1978), *Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A.)* 75, 691.
- 277. Bloch, K. (1977), *Adv.Enzym.Rel.Areas Mol.Biol.* 45, 1.
- 278. Hindsgaul, O. & Ballou, C.E. (1984), *Biochemistry* 23, 577
- 279. Hall, R.L., Wood, E.J., Kamerling, J.P., Gerwig, G.J. & Vliegenhart, J.F.G. (1977), *Biochem.J.* 165, 173.
- 280. Fukuda, K. & Hamada, A. (1978), *Biochim.Biophys.Acta* 544, 445.
- 281. Wheat, R.W. & Scheer, E. (1977), *Infect.Immunol.* 15, 340.
- 282. Gray, G.R. & Ballou, C.E. (1971), *J.Biol.Chem.* 246, 6835.
- 283. Lornitzo, F.A. & Goldman, D.S. (1968), *Biochim.Biophys.Acta* 158, 329.
- 284. Katz, A., Weckesser, G., Drews, G. & Mayer, H. (1977), *Arch.Microbiol.* 113, 247.
- 285. Kennedy, L.D. (1978), *Carbohydr.Res.* 61, 217.
- 286. Turvey, J.R. & Griffiths, L.M. (1973), *Phytochem.* 12, 2901.
- 287. Turvey, J.R. & Williams, E.L. (1976), *Carbohydr.Res.* 49, 419.
- 288. Duff, R.B. (1961), *J.Sci.Food Agric.* 12, 826.
- 289. Lynch, D.L., Olney, H.O. & Wright, L.M. (1958), *J.Sci.Food Agric.* 9, 5660.
- 290. Bonhours, J.F. & Cheshire, M.V. (1969), *Soil Biol.Biochem.* 1, 185.
- 291. Batey, J.F. & Turvey, J.R. (1975), *Carbohydr.Res.* 43, 133
- 292. Ugalde, R., comunicacion personal.
- 293. Kennedy, L.D. (1976), *Carbohydr.Res.* 52, 259.
- 294. Kennedy, L.D. & Bailey, R.W. (1976), *Carb.Res.* 49, 451.
- 295. Ver referencia 101, pg. 191-247.
- 296. Wolf, F.A. & Wolf, F.T. (1949), *The Fungi*, J.Wiley & Sons.
- 297. Mesland, D.A.M., Huisman, J.G. & Ende, H. van den (1974), *J.Gen.Microbiol.* 80, 111.

298. Werkman, B.A. & Ende, H. van den (1973), Archiv.fur Mikrobiol., 90, 365.
299. Berkeley, M.J. (1838), Lk.Mag.Zool.Botany 2, 340.
300. Bail, T. (1857), Ueber Hefe-Flora(Jena) 40, 417.
301. Pasteur, L. (1876), Etudes sur la biere, Gauthiers-Villars, Paris.
302. Fitz, A. (1873), Ber.Deut.Chem.Ges. 2, 48.
303. Reess, M. (1870), Botanische unter suchungen uber die Alkohol garunspieze. Arthur Felix, Leipzig.
304. Brefeld, O. (1873), Mucor racemosus und Hefe Flora (Jena) 56, 385.
305. Bartnicki-Garcia, S. (1963), Bacteriol.Rev. 27, 293.
306. Bartnicki-Garcia, S. & Nickerson, W.J. (1962), J.Bacteriol. 84, 829.
307. Bartnicki-Garcia, S. (1968), J.Bacteriol. 96, 1586.
308. Friedenthal, M., Epstein, A. & Passeron, S. (1974), J.Gen. Microbiol. 82, 15.
309. Bartnicki-Garcia, S. & Nickerson, W.J. (1962), J.Bacteriol. 84, 841.
310. Haidle, C.W. & Storck, R. (1966), J.Bacteriol. 92, 1236.
311. Passeron, S. & Roselino, E. (1971), Febs Lett. 18, 9.
312. Friedenthal, M., Roselino, E. & Passeron, S. (1973), Eur.J. Biochem. 35, 148.
313. Paveto, C., Epstein, A. & Passeron, S. (1975), Arch.Biochem Biophys. 169, 449.
314. Cantore, M.L., Galvagno, M.A. & Passeron, S. (1980), Arch. Bioch.Biophys. 199, 312.
315. Moreno, S. (1978), Tesis Doctoral, Fac. de Ciencias Ex. y Nat., U.B.A.
316. Moreno, S., Pastori, R. & Passeron, S. (1983), Mol.Cell. Biochem. 52, 13.
317. Garcia, J.R., Hiatt, W.R., Peters, J. & Sypherd, P.S.
318. Hiatt, W.R., Garcia, R., Merrick, W.C. & Sypherd, P.S. (1982), Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A.) 79, 3433.
319. Garcia, J.R. & Sypherd, P.S. (1984), Current Microbiol. 10 111.
320. Bartnicki-Garcia, S. & Nickerson, W.J. (1962), Biochim.

- Biophys. Acta 58, 102.
321. Bartnicki-Garcia, S. & Reyes, E. (1968), Biochim. Biophys. Acta 178, 54.
322. Bartnicki-Garcia, S. & Lindberg, B. (1972), Carbohydr. Res. 23, 75.
323. Dow, J.M. & Rubery, P.H. (1977), J. Gen. Microbiol. 99, 29.
324. Yamada, H., Hirawa, M. & Mijazaki, T. (1983), Carbohydr. Res. 119, 129.
325. Behrens, N.H. & Tabbra, E. (1978), Meth. Enzymol. 50, 402.
326. Garcia, R.C., Recondo, E. & Dankert, M. (1974), Eur. J. Biochem. 43, 93.
327. Iñon de Iannino, N.I., Staneloni, R.J., Behrens, N.H. & Dankert, M. (1979), Febs Lett. 99, 73.
328. Farodi, A.J., Staneloni, R.J., Cantarella, A.I., Leloir, L. F., Behrens, N.H., Carminatti, H. & Levy, L.A. (1973), Carbohydr. Res. 26, 373.
329. Spiro, M.J., Spiro, R.G. & Bhoyroo, V.D. (1976), J. Biol. Chem. 251, 6400.
330. Spiro, M.J., Spiro, R.G. & Bhoyroo, V.D. (1976), J. Biol. Chem. 251, 6420.
331. Fales, F.W. (1959), Anal. Chem. 31, 1898.
332. Ielpi, L. (1982), Tesis Doctoral, Fac. de Ciencias Ex. y Nat., U.B.A.
333. Bray, G.A. (1960), Anal. Biochem., 1, 279.
334. Mentaberry, A., Idoyaga-Vargas, V. & Carminatti, H. (1981), Exp. Eye Res. 33, 563.
335. Belocopitow, E., Marechal, L.R. & Quesada-Allue, L.A. (1977), Mol. Cell Biochem. 16, 127.
336. Bourne, E.J., Hutson, D.H. & Weigel, H. (1959), Chem. Ind. (London), 1047.
337. Engel, J.C. & Parodi, A.J. (1985), J. Biol. Chem., en prensa.
338. Bergman, A., Mankowski, T., Chojnacki, T., De Luca, L.M., Peterson, E. & Dallner, G. (1983), Biochem. J. 172, 123.
339. Behrens, N.H., Parodi, A.J. & Leloir, L.F. (1971), Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 68, 2857.
340. Ballou, L., Cohen, R.E. & Ballou, C.E. (1980), J. Biol. Chem. 255, 5986.

*...Por primera vez en la historia es posible ahora, debido a la Revolución Industrial y sus efectos, crear un mundo donde todos tengan una razonable oportunidad de felicidad. ...Los grandes terrores que han oscurecido el subconsciente de la raza humana, trayendo crueldad, opresión y guerra podrían ser disminuídos a tal punto que no sean más importantes.. ...La ciencia aplicada deberá ser el ingrediente principal. Sin física, fisiología o psicología no podremos construir el nuevo mundo. Podríamos construirlo sin latín y griego, sin Dante o Shakespeare, sin Bach y Mozart. Este es el gran argumento en favor de la ciencia aplicada. Lo he declarado en forma terminante porque lo siento así.*

*Sin embargo hay otra cara de la cuestión. ¿Cuál será la utilidad del bienestar y el tiempo libre si nadie recuerda como usarlos? La guerra contra el mal físico, como cualquier otra guerra no puede ser conducida con tal furia que haga al hombre incapaz de las artes de la paz.*

**BERTRAND RUSSELL**

